

LARISSA KOCHENBORGER

**EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE AGONISTAS ALFA-
ADRENÉRGICOS NA REGIÃO DA CONCHA DO NÚCLEO
ACCUMBENS SOBRE A ANSIEDADE E INGESTÃO DE
ALIMENTOS EM RATOS SACIADOS.**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao curso de Pós-
graduação em Neurociências
da Universidade Federal de
Santa Catarina, como
requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em
Neurociências.

**Orientador: Prof. Dr. Moacir
Serralvo Faria**

**Florianópolis, SC
2012.**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

K76e Kochenborger, Larissa
Efeito da microinjeção de agonistas alfa-adrenérgicos na
região da concha do núcleo Accumbens sobre a ansiedade e
ingestão de alimentos em ratos saciados [dissertação] /
Larissa Kochenborger ; orientador, Moacir Serralvo Faria. -
Florianópolis, SC, 2012.
71 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Neurociências.

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Núcleo Accumbens. 3. Clonidina. 4.
Fenilefrina. 5. Labirinto em cruz elevado. 6. Ansiedade. 7.
Ingestão de Alimentos. I. Faria, Moacir Serralvo. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Neurociências. III. Título.

CDU 612.82

Agora Nós Estamos Livres

Liberdade Poderosa

Libertadora da alma

Seja livre

Ande comigo

Através dos campos dourados

Tão adoráveis

Adoráveis

Nós lamentamos nossos pecados

Mas nós fazemos nosso próprio destino

É sob o meu rosto

Eu permaneço frágil

Sob meu rosto

Eu sorrio

Mesmo sozinho/ amedrontado

Sob Meu rosto eu estarei

Esperando

(Enya-Now we are free, trecho trad.)

AGRADECIMENTOS

Agradeço com a execução desse trabalho a muitas pessoas que me auxiliaram em todos os momentos dessa trajetória acadêmica, grande parte da caminhada é preciso fazer com os próprios erros e acertos, mas sempre há alguém caminhando ao nosso lado, e àqueles que caminharam comigo, meu muito obrigado:

A Deus, ser supremo e perfeito, por sua luz em todos os momentos de minha vida, por todas as coisas que colocou no meu caminho, pelos obstáculos que me fizeram crescer e pelo seu amor incondicional a todos os seres.

Aos meus pais Walter e Salete, pelos seres maravilhosos e incomparáveis que são, pelo imenso amor e dedicação sempre em toda a minha caminhada escolar, pelos grandes ensinamentos e por terem me mostrado um caminho de retidão e amor ao longo de minha vida, vocês são pessoas fundamentais para mim! Obrigada por existirem, amo vocês!

Agradeço fundamentalmente ao meu orientador o professor Dr. Moacir Serralvo Faria, que mesmo no princípio não me conhecendo pessoalmente confiou em mim e no meu potencial, abriu as portas de seu laboratório e permitiu a execução desse trabalho. Muito obrigada por tudo, pelas conversas, pelos momentos de ensinamento e pelo grande profissional, professor e cientista que és e que tem me ensinado a ser.

Aos meus ICs, Débora e Luigi, pelo apoio nesse projeto, pelas horas de experimento, pela companhia agradável e por compartilhar comigo momentos importantes, obrigada!

Agradeço aos meus amigos da pós-graduação e do departamento: Ana Paula, Natália, Fernanda, Dani, Anderson, Robson, Renata, Martina, Iracema, Péricles, Ana Cláudia, Ana Paula Taschetto,

Eduardo, Rafa, Laís, Paula, Camila, Diana, Marina, Fábio e quem sabe mais alguns que esqueci aqui de agradecer, meu muito obrigado a vocês meus grandes amigos, pelos momentos especiais que passamos juntos, pelas risadas, conversas, pelos momentos em construção, pelas trocas de idéias, pelo carinho e auxílio sempre em todos os momentos, vocês são parte da minha família e moram no meu coração. Obrigada!

Aos demais colegas do departamento pelo auxílio: Fernando, Tiago e demais colegas de laboratório e pós-graduação que sempre tiveram uma palavra amiga.

Aos professores que sempre cederam gentilmente seus laboratórios para a realização desse trabalho e que de alguma forma contribuíram para a execução do mesmo: professora Marta Aparecida Paschoalini, Mariana Graciela Terenzi, professor José Marino Neto e todos os professores que me deram aula na pós-graduação contribuindo para minha formação, Obrigada!

Aos professores membros da banca: Mariana Graciela Terenzi, Vander Baptista, Everson Araújo Nunes e Marta Aparecida Paschoalini por terem aceito o convite e pelas contribuições ao trabalho realizado.

Aos queridos e sempre amigos, Seu Carlos, Dona Vilma e Nivaldo, por tudo, todos os momentos de auxílio e amizade nesse período. Muito obrigada!

Ao meu namorado Maurício Fenilli pela paciência e carinho durante a escrita desse trabalho, período de ausência e renúncias, obrigada pela tranquilidade, por tudo que você representa pra mim, por ser assim tão especial, agradeço a compreensão sempre, eu te amo.

A minha amiga Marieli em especial, por todo o carinho, apoio e por caminhar ao meu lado nessa trajetória importante, me ouvindo sempre, meu muito obrigado! Sabes que tem um lugar muito especial em minha vida.

Ao meu amigo Lucas, por ser essa pessoa iluminada e maravilhosa em minha vida, obrigada por tudo, pelos momentos dentro

e fora do laboratório, pelos passeios, risadas, trocas de conhecimento, estudos, pelo companheirismo e amizade sempre, você é uma luz em meu caminho.

A minha amiga Cris por tudo que fez por mim nesse período, pelas trocas de idéias sobre tudo, os momentos de descontração, por me “socorrer” quando precisei muitas vezes, obrigada por você existir. Tem alguém que onde quer que esteja sente tanto orgulho quanto eu da pessoa que você é.

A minha amiga Fernanda por ser mais que uma colega de casa mas sim uma irmã que compartilhou muitos momentos importantes comigo nessa trajetória, obrigada pelo carinho, pelos auxílios, por todas as coisas maravilhosas que você faz por mim e sabe disso...

As minhas amigas de fora do laboratório, mas não menos importantes na minha vida: Iria e Luciana. Obrigada pelo carinho imenso!

Ao meu amigo Brunno pelo auxílio e pela amizade, foi muito bom conhecer você e descobrir a pessoa maravilhosa que você é!

A CAPES pelo apoio financeiro.

Aos animais que tornaram possível a realização desse trabalho.

RESUMO

Este estudo investigou o efeito de agonistas de α -adrenoceptores microinjetados na região da concha do núcleo accumbens (AcbSh) sobre a alimentação e os comportamentos relacionados à ansiedade em ratos saciados. Ratos Wistar machos com uma cânula cronicamente implantada no AcbSh foram unilateralmente microinjetados com clonidina (CLO, agonista α_2) ou fenilefrina (FEN, agonista α_1), nas doses de 6 e 20nmol em 0,2 μ l e submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE), um teste pré-clínico de ansiedade. Imediatamente após o teste do LCE, os animais foram submetidos à avaliação da ingestão de alimento por 30 minutos. Os dados mostraram que ratos microinjetados com CLO (20 nmol) no AcbSh apresentaram maior % de tempo nos braços abertos, que é compatível com um efeito do tipo ansiolítico. A ansiólise induzida por CLO foi corroborada pelo aumento de imersão de cabeça e diminuição de Stretched-Attend Postures (SAP), dois comportamentos etológicos motivados pelo medo. A atividade locomotora do animal não foi alterada pelas microinjeções de CLO no AcbSh no LCE. No entanto, nenhuma dose de FEN microinjetada no AcbSh foi capaz de alterar as variáveis representativas do medo / ansiedade e locomoção. A ingestão de alimentos não foi alterada por qualquer dose de CLO e FEN microinjetada no AcbSh, mas a microinjeção de CLO na dose de 20nmol induziu aumento da atividade locomotora no teste de ingestão de alimentos o que não aconteceu com CLO 6 nmol. Os dados sugerem que as aferências noradrenérgicas ao AcbSh podem ser a base de modulação do medo / ansiedade através dos receptores adrenérgicos α_2 , enquanto que o comportamento alimentar não sofre modulação noradrenérgica no AcbSh, pelo menos em ratos saciados.

Palavras-chave: Núcleo Accumbens. Clonidina. Fenilefrina. Labirinto em Cruz Elevado. Ansiedade. Ingestão de alimentos.

ABSTRACT

This study investigated the effect of α -adrenoceptor agonists microinjected into the shell region of the accumbens nucleus (AcbSh) on feeding and anxiety-related behaviours in free-feeding rats. Male Wistar rats with a chronically implanted cannula into the AcbSh were unilaterally microinjected with either clonidine (CLO, α_2 -adrenoceptor agonist) or Phenylephrine (PHE, α_1 -adrenoceptor agonist) at the doses of 6 and 20nmol and submitted to the elevated plus-maze (EPM), a pre-clinical test of anxiety. Immediately after the EPM test, the animals underwent food intake evaluation for 30 minutes. The data showed that rats microinjected with CLO (20 nmol/0.2 μ l) into the AcbSh exhibited increased %Open arm time, which is compatible with an anxiolytic-like effect. The CLO-induced anxiolysis was corroborated by increased head-dipping and decreased stretched-attend posture (SAP), two ethologically derived behaviours which are fear/anxiety-motivated. The animal's locomotor activity was not changed by 20nmol CLO microinjection into the AcbSh in EPM. However, neither dose of PHE microinjected into the AcbSh was able to alter either the spatial-temporal or ethological variables representative of fear/anxiety and locomotion. Food intake was not altered by any dose of CLO and PHE microinjected into the AcbSh, but the 20nmol CLO microinjection induced increased locomotor activity in the feeding test, this did not happen with CLO 6 nmol. The data suggests that noradrenergic afferents for the AcbSh may underlie fear/anxiety modulation through α_2 -adrenoceptor in the AcbSh, while feeding behaviour does not suffer noradrenergic modulation in the AcbSh of free-feeding rats.

Key Words: Nucleus Accumbens. Clonidine. Phenylephrine. Elevated Plus-Maze. Anxiety. Food intake.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. ANOVA DE UMA VIA INDICANDO OS EFEITOS PRINCIPAIS DOS COMPORTAMENTOS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO APÓS MICROINJEÇÃO UNILATERAL DE SALINA 0,9% E CLO NO ACBSH.....43

TABELA 2. ANOVA DE UMA VIA INDICANDO OS EFEITOS PRINCIPAIS DOS COMPORTAMENTOS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO APÓS MICROINJEÇÃO UNILATERAL DE SALINA 0,9% E FEN NO ACBSH.....44

TABELA 3. RESULTADOS DA ANOVA DE UMA VIA INDICANDO OS EFEITOS NAS VARIÁVEIS COMPORTAMENTAIS NO TESTE DA CAIXA DE INGESTÃO APÓS A MICROINJEÇÃO UNILATERAL DE SALINA (0,9%) OU CLO NO ACBSH.....46

TABELA 4. RESULTADOS DA ANOVA DE UMA VIA INDICANDO OS EFEITOS NAS VARIÁVEIS COMPORTAMENTAIS NO TESTE DA CAIXA DE INGESTÃO APÓS A MICROINJEÇÃO UNILATERAL DE SALINA (0,9%) OU FEN NO ACBSH.....47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. FOTO MICROGRAFIAS DE SECÇÕES CORONAIS DA PARTE ROSTRAL DO ESTRIADO DE HUMANOS E FOTO MICROGRAFIA DO CÉREBRO DO RATO, DEMONSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DO NÚCLEO ACCUMBENS.....	18
FIGURA 2: FIGURA ESQUEMÁTICA DEMONSTRANDO AS PROJEÇÕES DO ACB PARA OUTRAS REGIÕES E AS AFERÊNCIAS NAS REGIÕES DO CENTRO E CONCHA.....	19
FIGURA 3: FIGURA ESQUEMÁTICA DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	23
FIGURA 4. APARELHO ESTEREOTÁXICO UTILIZADO NOS PROCEDIMENTOS CIRÚRGICO..	29
FIGURA 5. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO UTILIZADO NOS EXPERIMENTOS.....	32
FIGURA 6. CAIXA DE REGISTRO DE COMPORTAMENTOS INGESTIVOS E NÃO-INGESTIVOS UTILIZADA NOS EXPERIMENTOS.....	33
FIGURA 7: DESENHOS SEMI-ESQUEMÁTICOS REPRESENTANDO CORTES CORONAIS DE 100 MM DO CÉREBRO DO RATO E AS MICROINJEÇÕES NA REGIÃO DA CONCHA DO ACB.....	36

FIGURA 8: FOTOMICROGRAFIA, DEMONSTRANDO O LOCAL DE UMA MICROINJEÇÃO..37

FIGURA 9: EFEITO ANSIOLÍTICO INDUZIDO PELA MICROINJEÇÃO DE CLONIDINA NA CONCHA DO NÚCLEO ACCUMBENS (ACBSh).....39

FIGURA 10: NÚMERO DE ENTRADAS NOS BRAÇOS ABERTOS E FECHADOS DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....40

FIGURA 11: REPRESENTAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE ENTRADAS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE).....41

FIGURA 12: REDUÇÃO DA PORCENTAGEM DE TEMPO NOS BRAÇOS ABERTOS DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE) INDUZIDO PELA MICROINJEÇÃO DE CLONIDINA NA CONCHA DO NÚCLEO ACCUMBENS (ACBSh).....42

FIGURA 13: AUMENTO O TEMPO DA LOCOMOÇÃO NA CAIXA DE REGISTROS COMPORTAMENTAIS INGESTIVOS E NÃO INGESTIVOS INDUZIDA PELA MICROINJEÇÃO DE CLONIDINA NA CONCHA DO NÚCLEO ACCUMBENS (ACBSh).....45

LISTA DE ABREVIações

Acb: Núcleo Accumbens

AcbSh: Região da concha do Núcleo Accumbens

CLO: Clonidina

FEN: Fenilefrina

ANOVA: Análise de Variância

NA: Noradrenalina

DA: Dopamina

DMT: Dexmedetomidina

GABA: Ácido γ -Aminobutírico

AMPA: Ácido α -Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol Propiônico

ip: Intraperitoneal

LCE: Labirinto em Cruz Elevado

SAP: Stretched-Attend Postures

IC: Imersão de Cabeça

%EA: Porcentagem de entrada nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado

EF: Número de Entrada nos Braços Fechados

%TA: Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos

TE: Total de entradas

EA: Número de entradas nos braços abertos

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIACÕES	12
1.INTRODUÇÃO.....	16
1.1 <i>Núcleo Accumbens: Anatomia e projeções</i>	<i>16</i>
1.2 <i>Ansiedade.....</i>	<i>20</i>
1.2.1 Ansiedade e Noradrenalina	20
1.2.2 Comportamentos defensivos e Labirinto em Cruz Elevado.....	21
1.2.3 Ansiedade e Ingestão alimentar.....	23
2.OBJETIVOS.....	27
2.1. <i>Objetivo Geral</i>	<i>27</i>
2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	<i>27</i>
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 <i>Animais</i>	<i>27</i>
3.2 <i>Drogas.....</i>	<i>28</i>
3.3 <i>Procedimento cirúrgico</i>	<i>28</i>

3.4	<i>Injeções Intracerebrais</i>	29
3.5	<i>Desenho do estudo</i>	30
3.6	<i>Procedimentos Experimentais</i>	30
3.5.1.	Experimento1 : Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	30
3.5.2.	Experimento2: Teste de Ingestão alimentar	32
3.7	<i>Perfusão e Histologia</i>	33
3.7	<i>Análise Estatística</i>	34
4.	RESULTADOS	35
4.1.	<i>Locais das microinjeções</i>	35
4.2.	<i>Experimento 1: Teste do Labirinto em Cruz Elevado</i>	37
4.3.	<i>Experimento 2: Teste de Ingestão alimentar</i>	45
5.	DISCUSSÃO	48
6.	CONCLUSÕES	54
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
8.	ANEXOS	70

1. INTRODUÇÃO

1.1 Núcleo Accumbens: Anatomia e projeções

O Núcleo Accumbens (Acb) é localizado medial à cabeça do Núcleo Caudado no prosencéfalo basal, (Figura 1) dorsal ao giro caudal do córtex órbito-frontal em humanos e dorsal ao tubérculo olfatório em ratos. (BASAR, et al., 2010). O Acb está intimamente envolvido em vários processos, tais como atividade motora (CARLSSON e CARLSSON, 1990; GARGIULO, 1996), motivação e reforço (KOOB, 1992; SALAMONE, 1994), cognição (ANNETT et al., 1989; DAVIDSON e IRWIN, 1999; SEAMANS e PHILLIPS, 1994; SETLOW e MCGAUGH, 1998; USIELLO et al., 1998), comportamento sexual (DAMSMA et al., 1992), estresse (ABERCROMBIE et al, 1989), além de comportamentos ingestivos e defensivos (PLIAKAS et al., 2001) e sabe-se que forma a maior parte do estriado ventral e é uma estrutura anatomicamente heterogênea dividida em duas regiões: a região do centro e a região da concha. Tem sido bem aceito pela literatura que a região do centro do Acb regula preferencialmente funções motoras, enquanto que a região da concha regula preferencialmente funções límbicas (ZAHM e BROG, 1992);

A região do centro do Acb recebe aferências primariamente de regiões dorsais do córtex medial pré-frontal, incluindo áreas pré-límbicas e área cingulada anterior (BASAR, et al., 2010), possuindo conexões bem estabelecidas com estruturas dos núcleos basais incluindo o Núcleo Subtalâmico, Globo Pálido e Substância Negra. Já a região da concha do Núcleo Accumbens está intimamente associada com o sistema límbico e interconectada com estruturas como o Pálido Ventral, a Área Tegmental Ventral, Hipotálamo lateral, Núcleo Leito da Estria Terminal e a Substância Cinzenta Periaquedutal. (DELFs, et al., 1998). As regiões CA1 da formação hipocampal e o subiculum também atingem a região da concha do Acb (GROENEWEGER, et al., 1987) e projeções da concha atingem as partes ventrais e mediais do Pálido

ventral e Área pré-óptica lateral adjacente (GROENEWEGEN, et al., 1993). Sabe-se de modo geral que as projeções do Acb atingem vários alvos, principalmente áreas palidais e estruturas nigrais, também a área pré-óptica, hipotálamo e áreas mesencefálicas. (figura 2) (BASAR, et al., 2010).

A região da concha do Acb está sob influência de múltiplos sistemas neuroquímicos, tais como glutamatérgico, opióide, dopaminérgico e noradrenérgico (ZAHM e BROG, 1992). Projeções glutamatérgicas provenientes de regiões envolvidas no processamento de estímulos emocionais, tais como o córtex pré-frontal medial, amígdala basolateral e formação hipocampal (MORGANE et al., 2005), convergem sobre os neurônios espinhosos GABAérgicos da concha do Acb (HEIDBREDER e GROENEWEGEN, 2003), indicando que a região da concha do Acb pode integrar estímulos emocionais que foram inicialmente processados pela amígdala e hipocampo (REYNOLDS e BERRIDGE, 2002; SEAMANS e PHILLIPS, 1994; SETLOW et al., 2000). A concha do Acb recebe projeções serotoninérgicas da rafe dorsal; projeções dopaminérgicas da parte medial da substância negra (BASAR, et al. 2010) e da área tegmental ventral relacionada a diferentes aspectos do condicionamento pelo medo (PEZZE e FELDON, 2004) e reforço (NAUTA et al., 1978); recebe projeções noradrenérgicas do núcleo do trato solitário (NTS; DELFS et al., 1998), indicando que alterações do estado fisiológico, (como alterações na pressão sanguínea) induzidas por estímulos de significado emocional relevante, também podem alcançar a concha do Acb através do NTS (DEV e PHILIP, 1996; GABRIEL e SELLER, 1970; PATON, 1998a; PATON, 1998b); também recebe considerável projeção noradrenérgica, proveniente de grupos de células noradrenérgicas do tronco cerebral caudal (BERRIDGE, et al., 1997), tornando assim a região da concha uma área estriatal única, devido as fibras noradrenérgicas serem praticamente inexistentes no resto do estriado.

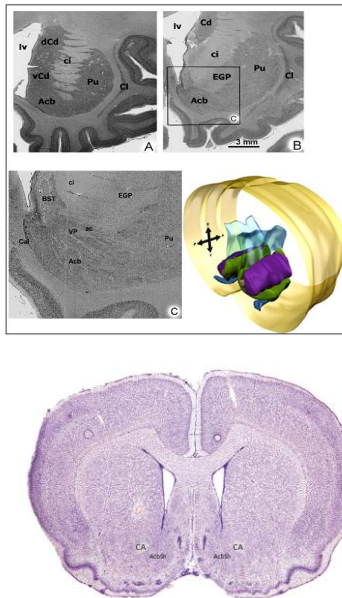


Figura 1. Foto micrografias de secções coronais da parte rostral do estriado de humanos e foto micrografia do cérebro do rato (em lilás), demonstrando a localização do Núcleo Accumbens. (A) Secção da parte rostral do Acb (B) Secção através da parte caudal. O retângulo em (B) mostra a área ampliada em (C). Abreviações: ac, comissura anterior; Acb, núcleo accumbens; BST, núcleo do leito da estria terminal; Cai, ilhas de Calleja; Cd, núcleo caudado; ci, cápsula interna; Cl, claustro; dCd, parte dorsal do Cd; EGP, segmento externo do globo pálido; Iv, ventrículo lateral; Pu, putamen; vCd, parte ventral do Cd; VP, pálido ventral. Por fim uma representação esquemática da anatomia regional do Acb, em roxo a região do centro do Acb, em verde a região da concha do Acb, Pálido ventral representado em azul escuro, em azul claro os ventrículos laterais e em marrom a comissura anterior. (Adaptado de BASAR, et al., 2010). Em lilás, cérebro do rato retirado do Atlas Paxinos e Watson 2007 (AcbSh- Região da concha do Acb e CA-Comissura anterior).

Em relação aos receptores alfa-adrenérgicos, estudos revelam a existência desses no Acb, sugerindo, inclusive, que os mesmos estão envolvidos na regulação da liberação de Noradrenalina (NA) (IHALAINEN E TANILA, 2004), por exemplo, autoreceptores alfa 2 pré-sinápticos quando estimulados, inibem a liberação de NA *in vivo* e *in vitro* (SCHOFFELMEER, et al., 1998) e também inibem a liberação de Dopamina (DA) no Acb (MURAI, et al., 1998). Sabe-se que os receptores alfa 1 também podem regular a liberação de NA no Acb e é sugerida a existência de receptores alfa 1 pré-sinápticos (AONO, et al., 2007). Apesar de conhecida a presença desses receptores no Acb e algumas de suas funções, pouco tem-se estudado sobre sua função de modulação no Acb na ansiedade e ingestão de alimentos, mesmo sendo de fundamental importância, uma vez que a NA em si tem um papel relevante nesses estados (TRIPICCHIO, 2007; WELLMAN, 2000).

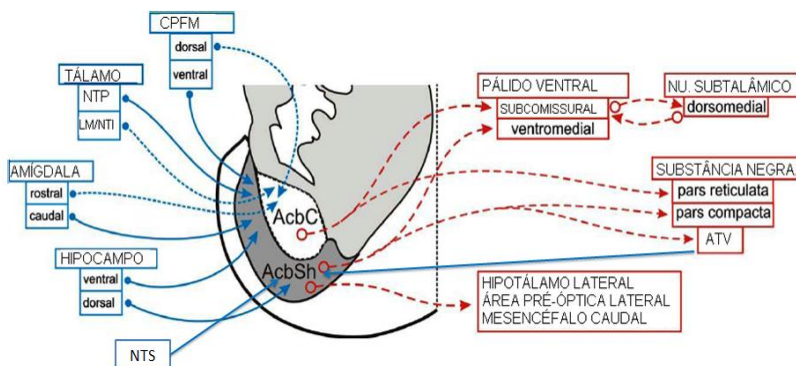


Figura 2: Figura esquemática demonstrando as projeções do Acb para outras regiões e as aferências nas regiões do centro e concha. Abreviações: CPFM, córtex pré-frontal medial; NTP, núcleo talâmico paraventricular; LM, linha média e NTL, núcleo talâmico intralaminar; ATV, área tegmental ventral; AcbC: Centro do Acb; AcbSh: Concha do Acb, NTS, núcleo do trato solitário (Adaptado de BASAR, et al., 2010, DELFS, et al., 1998, PEZZE e FELDON, 2004).

1.2 Ansiedade

1.2.1 *Ansiedade e Noradrenalina*

O transtorno de ansiedade acomete uma parte considerável da população no mundo inteiro e caracteriza-se por anormalidades em muitos sistemas neuroquímicos, neuroendócrinos, fisiológicos e neuroanatômicos (CONNOR E DAVIDSON, 1998). Na literatura, há estudos que demonstram que a ativação da neurotransmissão noradrenérgica pode aumentar o nível de ansiedade (RESSLER e NEMEROFF, 2000). Estudos clínicos também confirmam essa hiperativação nos transtornos de ansiedade, tais como os transtornos do pânico e de ansiedade generalizada (KALK et al., 2011). Estudos mostraram que anormalidades na neurotransmissão noradrenérgica podem levar a transtornos de ansiedade, tanto que o complexo noradrenalina - locus coeruleus - sistema nervoso simpático é fundamental no estado de alerta e ameaças e também que as vias noradrenérgicas possuem extrema relação com estados anormais de excitação e medo (CONNOR E DAVIDSON, 1998). A estimulação elétrica do locus coeruleus promove um estado análogo à ansiedade em animais, sugerindo que esse estado estaria relacionado à hiperatividade de neurônios noradrenérgicos e também a sintomas clássicos de ansiedade envolvem hiperatividade adrenérgica (TRIPICCHIO, 2007). Um aumento da liberação de noradrenalina no hipotálamo, na amígdala e no locus coeruleus induz o medo / ansiedade em ratos (TANAKA et al., 2000). Por outro lado, estudos envolvendo seres humanos apontam o Acb como substrato neural da ansiedade, embora os resultados, em semelhança à pesquisa básica, sejam discrepantes. Por exemplo, a estimulação cerebral profunda da região da concha do Acb é ansiolítica, visto que diminui os sintomas em pacientes com transtorno obsessivo-compulsivo (STURM et al., 2003), mas é ansiogênica em um paciente com transtorno compulsivo-obsessivo refratário, visto que elicia pânico (SHAPIRA et al., 2006). Apesar do papel da noradrenalina ser bem

conhecido em estados de ansiedade, o papel do Acb ainda precisa ser melhor investigado nessa modulação.

1.2.2 Comportamentos defensivos e Labirinto em Cruz Elevado

Comportamentos expressados em ambientes novos são influenciados por situações conflitivas pela presença simultânea de medo e curiosidade, e mudanças nesses estados motivacionais são observados em transtornos emocionais em humanos (MÄLLO, et al., 2007). O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um modelo bem estabelecido de ansiedade, baseado no estudo do comportamento puramente incondicionado e espontâneo (RODGERS, et, al., 1997), sabendo que uma resposta a aproximação de perigo poderia evocar diferentes reações, como avaliações de risco e também comportamentos de esquiva (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005). O LCE é atualmente utilizado como uma ferramenta para entender as bases biológicas da emocionalidade, da aprendizagem e da memória emocional e consiste em um aparato elevado do chão com quatro braços, dois fechados e dois abertos (figura 3).

Os índices primários de ansiedade avaliados no LCE são medidas espaço-temporais que se relacionam com a frequência de entradas nos braços abertos do aparato e a quantidade de tempo gasto nessas áreas aversivas (RODGERS E JOHNSON, 1995). As variáveis espaço-temporais do LCE compreendem o número de entradas nos braços abertos (EA), número de entradas nos braços fechados (EF), cuja variável é representativa da atividade locomotora do animal, visto que é pouco influenciada em níveis de ansiedade (CRUZ et al., 1994), sabe-se também que ansiolíticos clássicos aumentam a exploração dos braços abertos sem interferir na atividade motora (PELLOW et al, 1985). De modo geral sabe-se que os animais evitam esses espaços abertos apresentando diferentes comportamentos e índices de esquiva, e essa

esquiva do braço aberto provoca medo nos animais muito mais que os braços fechados (RODGERS E DALVI, 1997). As principais variáveis etológicas avaliadas são imersão de cabeça e SAP (Stretched-Attend Postures) (RODGERS et al., 1999; RODGERS et al., 1997, CRUZ, et al., 1994, RODGERS E DALVI, 1997), em que a redução do comportamento tipo SAP e um aumento de imersão de cabeça categorizam uma atividade ansiolítica no LCE.

A atuação do Acb na variação da ansiedade é discutida em alguns estudos que mostram que a microinjeção de antagonistas dos receptores AMPA (glutamatérgico) na concha do Acb evoca comportamentos defensivos em ratos, tais como fuga, mordidas defensivas e vocalizações durante a aproximação de perigo (REYNOLDS e BERRIDGE, 2003), sugerindo que o glutamato pode reduzir a ansiedade quando liberado na concha do Acb (efeito do tipo ansiolítico). Por outro lado, outros estudos indicam que o bloqueio dos receptores AMPA na concha do Acb induz efeito do tipo ansiolítico em ratos testados no LCE, sugerindo que a liberação de glutamato na concha do Acb é, ao contrário, ansiogênica (DA CUNHA et al., 2008a, 2008b). Agonistas GABA quando injetados na concha do Acb promoveram ansiólise em ratos testados no LCE (LOPES, et al., 2007). Com relação a neurotransmissão noradrenérgica envolvendo o Acb com comportamentos de ansiedade, essa relação demonstra-se ainda pouco investigada.

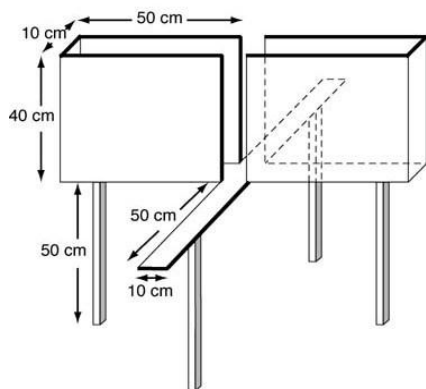


Figura 3: Figura esquemática do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) mostrando as medidas dos braços e altura do aparato (adaptado de Current protocols -Animal test of anxiety, FILE et al., 2005, <http://www.currentprotocols.com/protocol/ph0538>)

1.2.3 *Ansiedade e Ingestão alimentar*

Atualmente, os transtornos alimentares são uma grande preocupação para a sociedade, dentre esses, enquadram-se a anorexia e a bulimia nervosa, de acordo com a DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders- IV) (VARDAR e ENZERGIN, 2011). Sabe-se que existe um grande risco de desenvolvimento desses distúrbios na juventude atual (VARDAR e ENZERGIN, 2011), devido a preocupação com a aparência e a influência que mídia na sociedade. Sendo assim, é necessária uma maior atenção a esses transtornos.

A ansiedade física social é um conceito muito explorado em transtornos alimentares, que se refere à ansiedade em torno da

aparência, incluindo a forma do corpo e o medo de avaliação negativa por outros. É potencialmente relevante nas pessoas com bulimia nervosa, tanto a ansiedade social quanto o distúrbio da imagem corporal (KOSKINA et al., 2011). Além disso, esses diferentes estados motivacionais (ingestão de alimento e ansiedade) estão alterados em alguns distúrbios psiquiátricos. Os transtornos de ansiedade podem ser altamente prevalentes em pacientes com distúrbios alimentares, tais como anorexia e bulimia nervosa (GODART et al., 2000; SWINBOURNE et al., 2007) e transtornos de ansiedade com frequência existem antes dos transtornos alimentares (GODART et al., 2000).

Em relação aos modelos animais, estudos revelam que a restrição alimentar é capaz de alterar o nível de ansiedade em ratos (GENN et al., 2003a; 2003b), sendo considerada um modelo animal de anorexia nervosa (SIEGFRIED et al., 2003). Ratas jovens com atividades de anorexia revelaram comportamentos relacionados com ansiedade no LCE quando adultas, apresentando inclusive níveis plasmáticos de corticosterona elevados (KINZIG e HARGRAVE, 2010). Mais estudos envolvendo ansiedade e ingestão de alimentos são, de fato, muito relevantes para um melhor entendimento dos diferentes distúrbios alimentares existentes e sua possível relação com estados de ansiedade.

Em relação ao Acb, a modulação da ingestão de alimentos por opióides nesse núcleo está bem estabelecida tanto em seres humanos quanto em ratos (KELLEY et al., 2005). A microinjeção de agonistas dos receptores opióides do tipo μ na região da concha do Acb induz aumento da ingestão de alimentos em ratos (MACDONALD et al., 2004). Paralelamente, a microinjeção de morfina na concha do Acb reduziu o nível de ansiedade em ratos (ZARRINDAST et al., 2008) testados no labirinto em cruz elevado (LCE). Com relação à neurotransmissão GABAérgica, tem sido demonstrado que a microinjeção de agonistas dos receptores GABA_A e GABA_B na concha do Acb aumenta a ingestão de alimentos em ratos (REYNOLDS e BERRIDGE, 2001; BASSO e KELLEY, 1999; STRATFORD e KELLEY, 1999; STRATFORD e KELLEY, 1997), enquanto que a microinjeção de antagonistas GABA na concha do Acb diminui a ingestão de alimento induzida por agonistas GABAérgicos

(STRATFORD e KELLEY, 1997; ZNAMENSKY et al., 2001). Também tem sido demonstrado que a microinjeção de agonistas dos receptores GABA_A e GABA_B na concha do Acb é hiperfágica e ansiolítica em ratos saciados, testados no LCE (LOPES et al., 2007). Em ratos restritos de alimento por 24 horas, o efeito ansiolítico com agonistas GABAérgicos foi encontrado, porém não houve modulação de ingestão de alimentos (LOPES et al., 2011). Com relação à neurotransmissão glutamatérgica, elevados níveis de ingestão de alimento também têm sido obtidos pela microinjeção de antagonistas dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA na concha do Acb (KELLEY e SWANSON, 1997; STRATFORD et al., 1998), porém outro estudo mostra que microinjeção de antagonistas AMPA na região da concha do Acb não foram capazes de alterar a ingestão de alimentos em ratos (DA CUNHA, et al., 2008a).

Sabe-se que a ingestão de alimentos também é modulada pelo sistema noradrenérgico, por exemplo a ativação dos receptores adrenérgicos do tipo $\alpha 2$ no núcleo paraventricular hipotalâmico faz com que a ingestão de alimentos aumente; a ativação de receptores $\alpha 1$ e $\beta 2$ -adrenérgicos, demonstrou o contrário – inibição da ingestão de alimentos (WELLMAN, 2000; RAMOS et al., 2005). A participação e importância dos receptores $\alpha 1$ e β é bem estabelecida na inibição da ingestão de alimentos (RACOTTA e SOTO-MORA, 1993). NA injetada intraperitonealmente (ip) também inibiu significativamente a ingestão de alimentos e água, enquanto injetada intramuscularmente não alterou os níveis de ingestão (RACOTTA, et al., 1995). Apesar da existência de muitos estudos envolvendo NA e ingestão de alimentos, a literatura pouco trata do envolvimento do Acb e da NA nessa modulação.

Transtornos de ansiedade são muito prevalentes mundialmente, constituindo um considerável ônus econômico e social para os pacientes e consequentemente para suas famílias (CHEN e SHI, 2011) e sabe-se que a neurotransmissão noradrenérgica é muito importante na modulação da ansiedade e ingestão alimentar (SILVERSTONE, 2004; BRUNELLO et al., 2003, TANAKA, et al., 2000, WELLMAN, 2000). Distúrbios relacionados à ingestão de alimentos, distúrbios de ansiedade e diversas patologias relacionadas com os mesmos, são muito discutidas

e estudadas atualmente, sendo assim, pesquisas cada vez mais abrangentes sobre esses temas fazem-se necessárias. O presente estudo avalia o efeito de microinjeções de agonistas alfa-adrenérgicos na região da concha do Acb sobre os mecanismos da ansiedade e ingestão de alimentos em ratos, de modo que se possa compreender mais a atuação desses agonistas nessa região e seus efeitos sobre a modulação da ansiedade e comportamentos ingestivos, uma vez que a literatura pouco dispõe acerca dessa relação e não há trabalhos demonstrando o envolvimento desses receptores na região da concha do Acb sobre esses estados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar o papel dos receptores alfa adrenérgicos na concha do Acb sobre a ansiedade e ingestão de alimento em ratos.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da microinjeção de Fenilefrina (FEN, agonista alfa1) e Clonidina (CLO, agonista alfa2) na concha do Acb sobre o nível de ansiedade de ratos no LCE.
- Avaliar o efeito da microinjeção de Fenilefrina e Clonidina na concha do Acb sobre a ingestão de alimento de ratos saciados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, pesando entre 250 e 300g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em grupos de cinco em caixas de polipropileno (49 x 34 x 16cm); cobertas com grades e forradas com maravalha. Os animais foram submetidos a sete dias de adaptação ao biotério do laboratório com livre acesso à água e ração (CR-1, Nuvilab), sob temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acendendo às 06:00h e apagando as 18:00h). Os animais foram manipulados apenas para limpeza das caixas (a cada dois dias), pesagem, procedimento cirúrgico e administração de drogas dos procedimentos experimentais.

Todos os procedimentos realizados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética ao Uso de Animais (CEUA) (PP00363 / 23080.019003/ 2009-16) da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.2 Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas: Fenilefrina (FEN-agonista $\alpha 1$; 6 e 20 nmol) e Clonidina (CLO-agonista $\alpha 2$; 6 e 20 nmol), ambas provenientes do fornecedor Tocris Bioscience. As doses utilizadas foram baseadas na literatura (MANSUR, et al. 2010; MANSUR, et al. 2011). As drogas foram diluídas em veículo (salina-NaCl 0,9%), Os grupos controles foram injetados com salina e todas as drogas foram injetadas no volume de 0,2 μ l.

3.3 Procedimento cirúrgico

Para a implantação da cânula-guia (17 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro externo, confeccionadas com agulhas hipodérmicas), os animais receberam uma mistura de anestésico (Ketamina/ 87 mg.kg⁻¹ e Xilasina/ 13 mg.kg⁻¹), via i.p. e, em seguida foram adaptados ao aparelho estereotáxico (Figura 4.), onde a cabeça foi fixada por barras laterais encaixadas no conduto auditivo e a boca fixada em uma presilha dental, de modo que a cabeça do animal permanecesse fixa, em linha reta e imóvel, facilitando assim o procedimento cirúrgico. Após a remoção dos pêlos da cabeça do animal foi feita uma assepsia com álcool iodado e posteriormente foi realizada a incisão longitudinal no escalpo, expondo assim a calota craniana. O periósteo foi removido, de modo a visualizar melhor a região da calota craniana chamada bregma (ponto de intersecção das suturas coronal e sagital) de onde as medições para a implantação da cânula foram iniciadas. Após a assepsia com peróxido de hidrogênio de 10 volumes, a cânula guia, já então fixada no aparelho estereotáxico, foi posicionada exatamente acima do bregma e a partir daí foram feitas as seguintes medições segundo o atlas de PAXINOS e WATSON (2007): Ântero-posterior (AP)- 1,5 do bregma, anterior a linha interaural; Lateral (L)- 0,1 para cada lado da sutura sagital; Dorso-ventral (DV)- 0,56 abaixo da

dura-mater. O crânio do animal foi então perfurado por uma broca de uso odontológico para implantação da cânula-guia e colocação de parafusos de fixação em um ponto oposto ao de fixação da cânula. A cânula-guia foi implantada unilateralmente, sempre do lado esquerdo do encéfalo do animal. Sua fixação foi feita por meio de parafusos de joalheiro. Após isso a superfície da calota foi recoberta por acrílico auto-polimerizável, formando uma superfície fixa onde a cânula implantada tornou-se imóvel e resistente aos choques mecânicos com a caixa de hospedagem do animal, e em seguida foi introduzido um fio odontológico dentro da cânula de modo a não entupir o espaço interno da mesma com resíduos em geral. Após isso o animal retornou para o biotério em uma caixa individual e foi mantido com água e ração *ad libitum* por um período de 7 dias até a realização dos procedimentos experimentais.



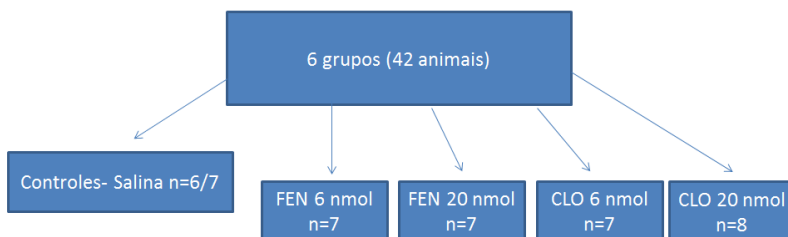
Figura 4. Aparelho estereotáxico utilizado nos procedimentos cirúrgicos.

3.4 Injeções Intracerebrais

Para as microinjeções de drogas e veículo foram utilizadas agulhas injetoras (agulha intragengival de uso odontológico, diâmetro

de 0.3 mm), conectada em um tubo de polietileno (P10). O tubo de polietileno foi conectado a uma seringa de Hamilton (capacidade de 1µl). A agulha injetora excedeu o comprimento da cânula-guia em 2 mm, sendo que a cânula não foi implantada até a altura do núcleo visando evitar possíveis lesões prévias aos procedimentos experimentais. Para evitar variações da pressão intracerebral, após a inserção da agulha injetora, foi esperado o período de 1 minuto para iniciar a injeção, a qual foi feita ao longo de 1 minuto. Após a microinjeção das drogas ou veículo (volume padrão de 0,2 µl), o animal retornou a sua caixa de hospedagem e foi aguardado um período de 5 minutos para os testes comportamentais para a difusão da droga no encéfalo do animal.

3.5 Desenho do estudo



3.6 Procedimentos Experimentais

3.5.1. Experimento1 : Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE possui duas passarelas de madeira dispostas perpendicularmente formando uma cruz simétrica. Cada braço do labirinto possui 50 centímetros de comprimento e 10 centímetros de largura, dois braços são fechados por paredes laterais de vidro fumê, de 40 centímetros de altura, enquanto os outros dois braços opostos são

abertos, com apenas uma pequena borda lateral de vidro de um centímetro, visando reduzir a ocorrência de quedas (Figura 5). Na união dos quatro braços delimita-se uma pequena área central de 100 centímetros quadrados e o aparato como um todo se encontra a uma elevação de 50 centímetros do chão. Acima de cada braço, a uma altura de 1 metro, há uma lâmpada de 15w, utilizadas como a única fonte de iluminação do procedimento experimental.

O animal foi posicionado na porção central do labirinto, com a face voltada para um dos braços fechados, permitindo-lhe explorar livremente o labirinto pelo período de 5 minutos. Após esse período o animal foi retirado e o labirinto foi limpo com tecido umedecido com solução alcoólica de 20% a fim de evitar pistas odoríferas para a exposição do próximo animal ao labirinto. As sessões experimentais foram filmadas com o auxílio de uma webcam e posteriormente transcritas com o auxílio do programa Etholog 2.25 (OTTONI, 2000). Os experimentos foram realizados sempre no período matutino (8:00h às 12:00h), com o experimentador fora da sala de teste.

As variáveis comportamentais foram divididas em espaço-temporais e etológicas. As variáveis espaço-temporais são o número de entradas nos braços abertos (EA), o número de entradas nos braços fechados (EF) que caracteriza a atividade locomotora do animal e o número total de entradas (TE). Outras variáveis espacial-temporais avaliadas foram a porcentagem de entrada nos braços abertos (%EA) e a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (%TA). “*Entrada*” e “*Saída*” dos braços foram definidas como a colocação das quatro patas do animal dentro ou fora de um braço, respectivamente. Já as variáveis etológicas compreendem comportamentos típicos da espécie (SETEM et al, 1999), tais como SAP (Stretched-Attend Postures), (RODGERS, et al., 1997), (movimento no qual o animal sai de um dos braços fechados com as patas dianteiras e cabeça somente, investigando a sua volta), exploração vertical (movimento vertical no qual o animal mantém seu corpo erguido somente pelas patas traseiras) e imersão de cabeça (IC) (movimento exploratório de cabeça/ombros sobre a borda lateral dos braços abertos em direção ao chão).



Figura 5. Labirinto em Cruz Elevado utilizado nos experimentos.

3.5.2. Experimento2: Teste de Ingestão alimentar

O animal foi colocado em uma caixa de polipropileno (49 x 34 x 16cm), com um espelho na lateral, permitindo melhor observação dos comportamentos do animal, e em angulação para que o animal não se visualizasse pelo mesmo (Figura 6), contendo somente água e ração *ad libitum*, previamente pesados.

Os seguintes comportamentos na caixa de ingestão foram avaliados: ingestão de alimentos e ingestão de água e os comportamentos não-ingestivos, dentre eles, exploração do alimento: quando o animal manipula e cheira o alimento sem ingeri-lo (HALFORD, 1998), exploração vertical: ato de explorar o ambiente apoiado somente nas patas traseiras, estando com as patas dianteiras livres, não apoiadas no chão da caixa, ou seja, o animal permanece ereto, auto-limpeza: ato de limpar qualquer parte da superfície corporal com a língua, dentes e/ou patas dianteiras. (SETEM et al., 1999), locomoção: é o ato de deslocar-se, deambular pela caixa experimental (HALFORD, 1998) e o tempo que o animal se desloca para frente, para trás ou para os lados na caixa de ingestão. SAP: movimento de projeção do corpo do animal, retornando à posição inicial onde as patas traseiras ficam fixas na base da caixa enquanto as dianteiras se movem para

frente e, em seguida, retornam a posição original. Essa variável comportamental está diretamente relacionada com o nível de medo do animal e foi modificada do LCE para a caixa de ingestão, utilizando-se como referencial a definição de CRUZ (1994). Esses comportamentos do animal foram então registrados em uma webcam durante 30 minutos.

Findo o período de registro, a ração restante na caixa experimental foi pesada e o consumo de alimento avaliado pela diferença entre a quantidade inicial e final de ração. Com o objetivo de evitar pistas odoríferas, após cada teste, a caixa experimental foi limpa com tecido umedecido em solução alcoólica 20%. Os registros em vídeo foram então analisados posteriormente com o auxílio do programa Etholog 2.25 (OTTONI, 2000).



Figura 6. Caixa de registro de comportamentos ingestivos e não-ingestivos utilizada nos experimentos.

3.7 Perfusão e Histologia

Após os procedimentos experimentais os animais foram anestesiados com Uretana (1.75 mg/kg) e perfundidos transcordialmente com solução salina (0,9%) e formol (10%). Logo depois de dissecado, o

encéfalo do animal permaneceu em formol 10% por um período de sete dias, sendo posteriormente cortado em um vibrátomo em fatias de 100 µm de espessura. As fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas com aproximadamente oito fatias por lâmina e permaneceram secando por um período de sete dias. Após secas, passaram pelo processo de coloração, pelo método de Nissl, onde sobre as lâminas foi colada uma lamínula. Após a coloração, as fatias retornaram ao processo de secagem por mais uma semana. Quando prontas, as lâminas foram observadas em um microscópio óptico. A representação gráfica dos cortes e pontos das microinjeções foram interpretados por meio do atlas do encéfalo de rato PAXINOS e WATSON (2007).

3.7 Análise Estatística

Os dados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, tendo como variável independente o tratamento com as drogas: FEN, CLO e salina 0,9%. Quando significativa, a ANOVA foi seguida do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações. Apenas valores de probabilidade menores que 5% foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Locais das microinjeções

A análise histológica das microinjeções mostrou que 42 animais apresentaram as microinjeções na região da concha do Acb (Regiões rostral, medial e caudal do Acb) (Figura 7 e 8). Os animais que tiveram as cânulas-guia e microinjeções em outras áreas que não fosse a região da concha do Acb não foram incluídos na análise estatística, uma vez que as regiões atingidas foram muito variadas e não foi possível o fechamento de grupos específicos por região.

Os grupos das microinjeções de droga e veículo na região da concha do Acb e doses administradas foram:

- 6 animais receberam microinjeção de veículo (SAL1 0,9%) – grupo controle para CLO.
- 7 animais receberam microinjeção de veículo (SAL2 0,9%) – grupo controle para FEN.
- 7 animais receberam microinjeção de FEN 6nmol.
- 7 animais receberam a microinjeção de FEN 20nmol.
- 7 animais receberam a microinjeção de CLO 6nmol.
- 8 animais receberam a microinjeção de CLO 20nmol.

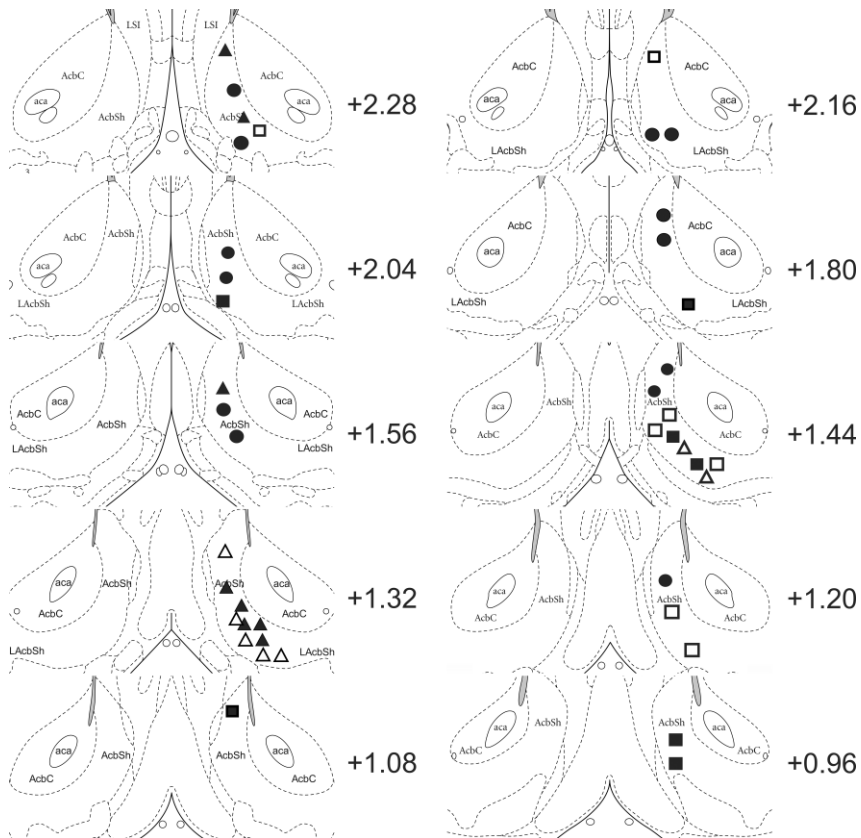


Figura 7: Desenhos semi-esquemáticos representando cortes coronais de 100 μ m do cérebro do rato, retiradas do atlas PAXINOS e WATSON (2007) e as microinjeções na região da concha do Acb. As drogas foram injetadas nas doses de 6 e 20 nmol/0.2 μ l: (□) FEN 6 nmol; (■) FEN 20 nmol; (▲) CLO 20 nmol (△) CLO 6 nmol; (●) SAL. ABREVIATURAS: AcbC: Região do centro do Núcleo do Accumbens, AcbSh: Região da concha do Accumbens, LA cbSh: Região lateral do Accumbens, aca: Parte anterior da comissura anterior, LSI: Parte intermediária do Núcleo septal lateral.

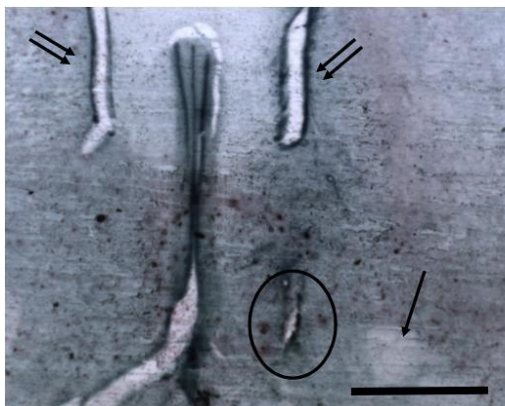


Figura 8: Fotomicrografia, demonstrando o local de uma microinjeção. Na seta simples está demonstrada a Comissura anterior (CA), as setas duplas demonstram os ventrículos laterais (VL), o local da microinjeção está demonstrado com o elipse em preto, localizado na região da concha do Núcleo Accumbens. Escala: 100 μ m. (AP=2,28. PAXINOS E WATSON, 2007)

4.2 Experimento 1: Teste do Labirinto em Cruz Elevado

A ANOVA de uma via revelou alterações significantes com a microinjeção de CLO 20nmol em relação ao controle, nos comportamentos de SAP [$F = (2,18) = 6,57; p < 0,05$] e IC [$F = (2,18) = 11,31; p < 0,05$] (Tabela 1); foi reduzida a frequência de SAP (Figura 9A) e aumentada a frequência de IC (Figura 9C) em relação ao grupo controle, notando, assim, um efeito ansiolítico.

As entradas nos braços abertos (EA) [$F = (2,18) = 2,47; p = \text{NS}$] e fechados (EF) [$F = (2,18) = 0,56; p = \text{NS}$] não foram alteradas com as microinjeções de CLO maior e menor dose (Figura 10A e 10C), assim como o total de entradas (TE), também não foi alterado em nenhuma das doses de CLO [$F = (2,18) = 1,11; p = \text{NS}$] em relação ao grupo controle (Figura 11). Porém, a porcentagem de tempo nos braços

abertos (%TA) foi significativamente maior para animais tratados com CLO maior dose (Figura 12A) [$F = (2,18) = 4,07$; $p < 0,05$], dado que contribui com os dados de SAP e IC, de um efeito ansiolítico com a microinjeção da maior dose de CLO, no entanto, com as microinjeções de CLO menor dose (Figura 12A), não houve efeito significativo. A porcentagem de entrada nos braços abertos permaneceu inalterada com as microinjeções de CLO em todas as doses [$F = (2,18) = 2,53$; $p = \text{NS}$] (Figura 12C).

SAP e IC não foram alterados com as microinjeções de FEN em relação ao grupo controle em qualquer uma das duas doses administradas. (Figura 9B e 9D) (Tabela 2). EA e EF não foram alteradas com as microinjeções de FEN maior e menor dose (EA) [$F = (2,18) = 0,03$; $p = \text{NS}$], (EF) [$F = (2,18) = 0,03$; $p = \text{NS}$] (Figura 10B e 10D), assim como TE também não foi alterado em nenhuma das doses de FEN [$F = (2,18) = 0,01$; $p = \text{NS}$] em relação ao grupo controle. A %TA não foi significativa para animais tratados com FEN [$F = (2,18) = 0,12$; $p = \text{NS}$] maior e menor dose (Figura 12B). A porcentagem de entrada nos braços abertos (%EA) permaneceu inalterada com as microinjeções de FEN em todas as doses [$F = (2,18) = 0,42$; $p = \text{NS}$] (Figura 9D). A fim de descartar a possibilidade dos efeitos de CLO 20 nmol resultar da dispersão da droga para o ventrículo lateral, em um experimento adicional, CLO 20 nmol foi microinjetada no ventrículo lateral ($n = 7$), enquanto o grupo controle ($n = 6$) recebeu microinjeção com solução salina 0,9%. ANOVA não revelou um efeito significativo para a variável principal, %TA ($F_{1, 11} = 0,10$, $p = 0,75$; CLO, $2,71 \pm 1,87$; 0,9% Salina, $3,66 \pm 2,39$), SAP ($F_{1, 11} = 2,17$, $p = 0,16$; CLO, $3,85 \pm 0,76$; 0,9% Salina, $6,00 \pm 1,29$) e variável IC ($F_{1, 11} = 0,07$, $p = 0,78$; CLO, $0,85 \pm 0,45$; 0,9% Salina, $0,66 \pm 0,49$).

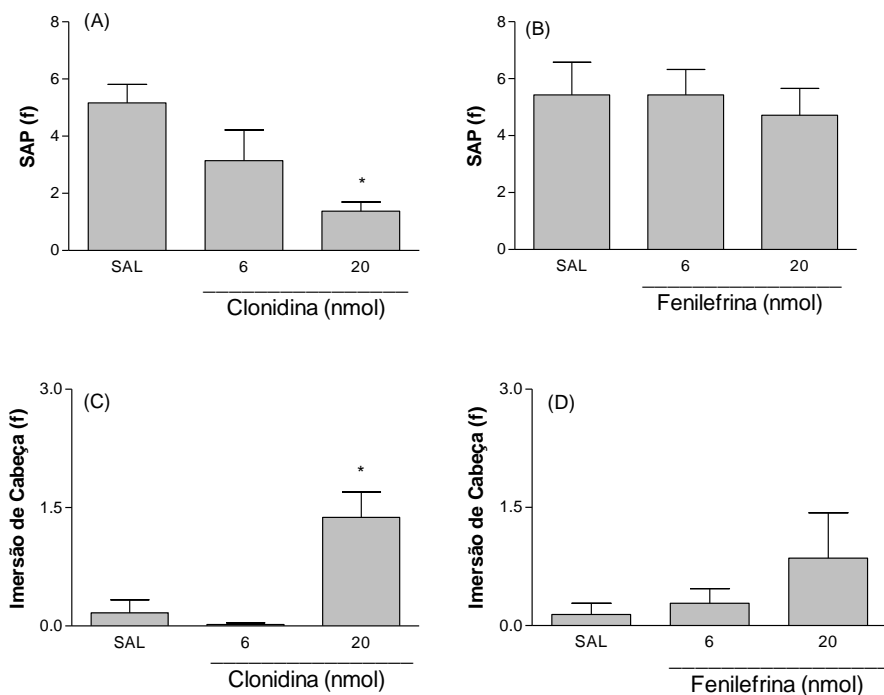


Figura 9: Efeito ansiolítico induzido pela microinjeção de clonidina na concha do núcleo accumbens (AcbSh). Ratos foram microinjetados unilateralmente com salina (SAL, $n=6/7$), clonidina (nas doses de 6, $n=7$ ou 20 nmol, $n=8$), ou fenilefrina (nas doses de 6, $n=7$ ou 20 nmol, $n=7$) no AcbSh e submetidos ao labirinto em cruz elevado por 5 minutos. A frequência de SAP (Stretched-Attend Postures) é representado nos painéis A e B e a frequência de imersão de cabeça nos painéis C e D. Cada coluna representa a média \pm o erro padrão da média. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com salina. (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações).

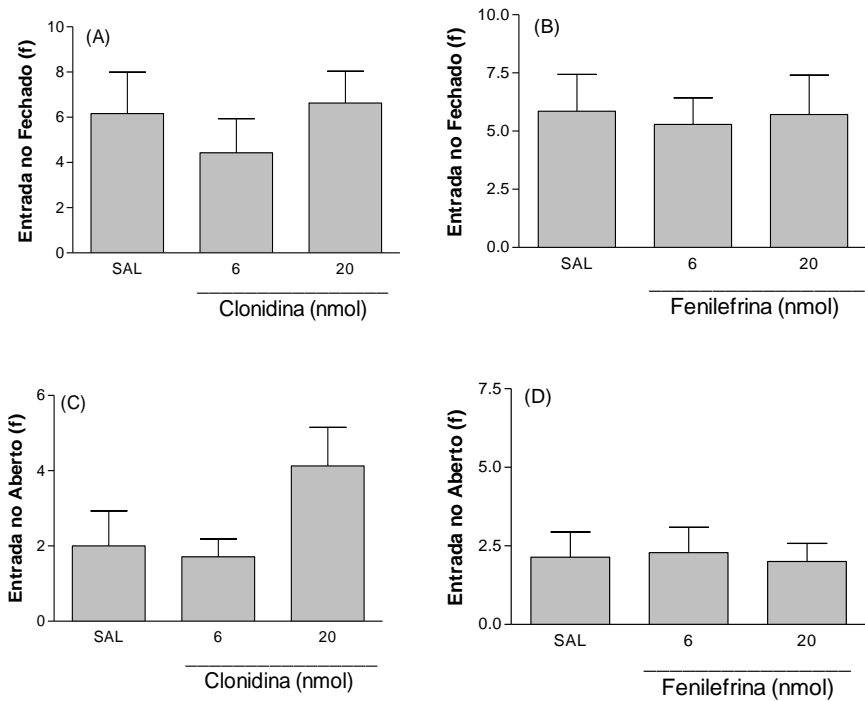


Figura 10: Número de entradas nos braços abertos e fechados do Labirinto em Cruz Elevado. Ratos foram microinjetados unilateralmente com salina (SAL, n=6/7), clonidina (nas doses de 6, n=7 ou 20 nmol, n=8), ou fenilefrina (nas doses de 6, n=7 ou 20 nmol, n=7) na concha do núcleo accumbens (AcbSh) e submetidos ao labirinto em cruz elevado por 5 minutos. O número de entradas nos braços fechados do labirinto é representado nos gráficos A e B e a o número de entradas nos braços abertos em C e D. Cada coluna representa a média \pm o erro padrão da média. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações).

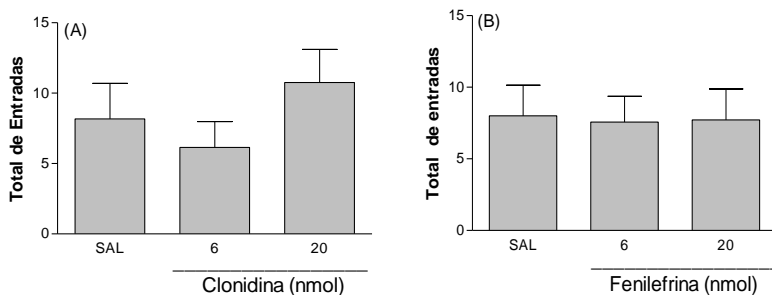


Figura 11: **Representação do número total de entradas no Labirinto em Cruz Elevado (LCE).** Ratos foram microinjetados unilateralmente com salina (SAL, n=6/7), clonidina (nas doses de 6, n=7 ou 20 nmol, n=8), ou fenilefrina (nas doses de 6, n=7 ou 20 nmol, n=7) na concha do núcleo accumbens (AcbSh) e submetidos ao labirinto em cruz elevado por 5 minutos. O número total de entradas nos braços abertos e fechados do LCE está representado em A e B. Cada coluna representa a média \pm o erro padrão da média. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com salina. (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações).

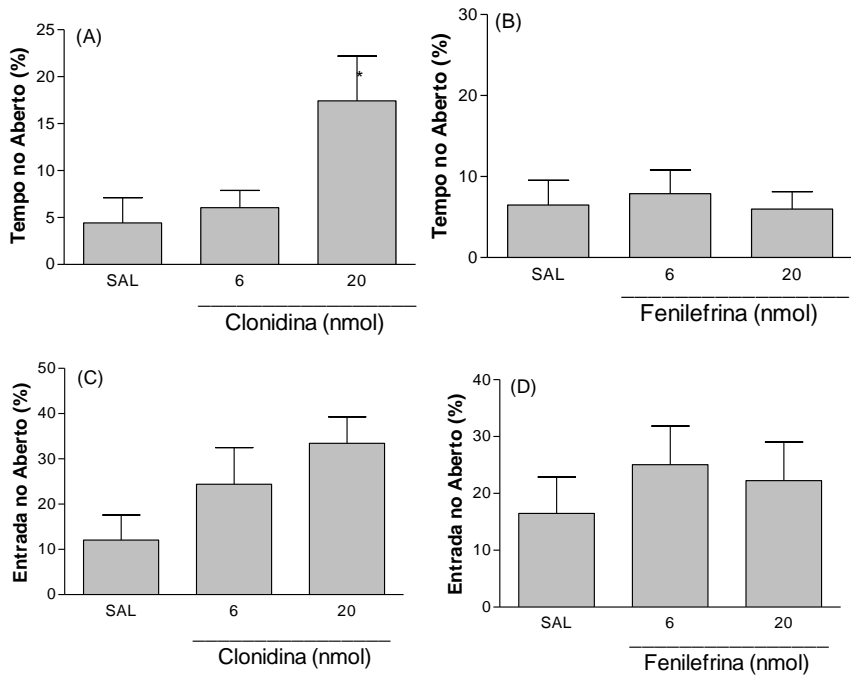


Figura 12: Redução da porcentagem de tempo nos braços abertos do Labirinto em Cruz elevado (LCE) induzido pela microinjeção de clonidina na concha do núcleo accumbens (AcbSh): Ratos foram microinjetados unilateralmente com salina (SAL, $n=6/7$), clonidina (nas doses de 6, $n=7$ ou 20 nmol, $n=8$), ou fenilefrina (nas doses de 6, $n=7$ ou 20 nmol, $n=7$) no AcbSh e submetidos ao labirinto em cruz elevado por 5 minutos. A porcentagem de tempo nos braços abertos é representada nos gráficos A e B e porcentagem de entradas nos braços abertos está representada em C e D. Cada coluna representa a média \pm o erro padrão da média. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com salina. (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações).

Tabela 1. ANOVA de uma via indicando os efeitos principais dos comportamentos no labirinto em cruz elevado após microinjeção unilateral de salina 0,9% e CLO no AcbSh.

Variáveis	SAL (6)	CLO 6 (7)	CLO 20 (8)	ANOVA
Entrada no fechado	6,16 ± 1,83	4,42 ± 1,50	6,62 ± 1,41	$F_{2,18} = 0,56$; p=NS
Entrada no aberto	2,00 ± 0,93	1,71 ± 0,47	4,12 ± 1,02	$F_{2,18} = 2,47$; p=NS
Entradas totais	8,16 ± 2,52	6,14 ± 1,84	10,75 ± 2,35	$F_{2,18} = 1,11$; p=NS
%Tempo no aberto	4,43 ± 2,68	6,05 ± 1,82	17,43 ± 4,75*	$F_{2,18} = 4,07$; p<0,05
%Entradas no aberto	12,08 ± 5,54	24,39 ± 8,08	33,45 ± 5,82	$F_{2,18} = 2,53$; p=NS
Auto-limpeza	5,00 ± 0,81	2,57 ± 0,61	3,75 ± 0,72	$F_{2,18} = 2,63$; p=NS
Exploração vertical	14,16 ± 2,38	9,85 ± 2,87	12,00 ± 1,33	$F_{2,18} = 0,87$; p=NS
IC	0,16 ± 0,16	0,01 ± 0,01	1,37 ± 0,32*	$F_{2,18} = 11,31$; p<0,05
SAP	5,16 ± 0,65	3,14 ± 1,07	1,37 ± 0,32*	$F_{2,18} = 6,57$; p<0,05

Os dados estão expressados em media ± erro padrão da média. Os números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. Ratos foram unilateralmente injetados com salina (0,9%) ou CLO nas doses de 6 e 20 nmol no AcbSh e subsequentemente testados (5 min) no LCE. *p<0.05. NS indica que não houve significância. ANOVA foi seguida do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações.

Tabela 2. ANOVA de uma via indicando os efeitos principais dos comportamentos no labirinto em cruz elevado após microinjeção unilateral de salina 0,9% e FEN no AcbSh.

Variáveis		SAL (7)	FEN 6 (7)	FEN 20 (7)	ANOVA
Entrada	no	5,85 ± 1,58	5,28 ± 1,14	5,71 ± 1,68	$F_{2,18} = 0,03$; p=NS
fechado					
Entrada no aberto		2,14 ± 0,79	2,28 ± 0,80	2,00 ± 0,57	$F_{2,18} = 0,03$; p= NS
Entradas totais		8,00 ± 2,13	7,57 ± 1,79	7,71 ± 2,16	$F_{2,18} = 0,01$; p= NS
%Tempo no aberto		6,47 ± 3,05	7,88 ± 2,92	5,99 ± 2,13	$F_{2,18} = 0,12$; p=NS
%Entradas	no	16,47 ± 6,42	25,05 ± 6,78	22,23 ± 6,80	$F_{2,18} = 0,42$; p=NS
aberto					
Auto-limpeza		4,71 ± 0,74	3,71 ± 1,12	4,14 ± 0,59	$F_{2,18} = 0,34$; p=NS
Exploração vertical		13,14 ± 2,26	10,42 ± 1,26	10,71 ± 3,68	$F_{2,18} = 0,32$; p=NS
IC		0,14 ± 0,14	0,28 ± 0,18	0,85 ± 0,59	$F_{2,18} = 1,05$; p=NS
SAP		5,42 ± 1,15	5,42 ± 0,89	4,71 ± 0,94	$F_{2,18} = 0,16$; p=NS

Os dados estão expressados em média ± erro padrão da média. Os números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. Ratos foram unilateralmente injetados com salina (0,9%) ou Fenilefrina (FEN) nas doses de 6 e 20 nmol no AcbSh e subsequentemente testados (5 min) no LCE. *p<0.05. NS indica que não houve significância. ANOVA foi seguida do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações.

4.3. Experimento 2: Teste de Ingestão alimentar

ANOVA não revelou nenhum efeito significativo principal para a ingestão de alimentos, exploração de alimentos, ingestão de água, auto-limpeza, SAP e exploração vertical em qualquer tipo de tratamento tanto de CLO (Tabela 3) quanto FEN (Tabela 4) no teste de ingestão de alimentos, mas a locomoção teve efeitos com o tratamento com dose mais elevada de CLO; *post-hoc* mostrou aumento da locomoção, sugerindo mudanças na atividade locomotora dos animais com CLO 20nmol (Figura 13). O tratamento com FEN não mostrou nenhuma alteração na atividade locomotora.

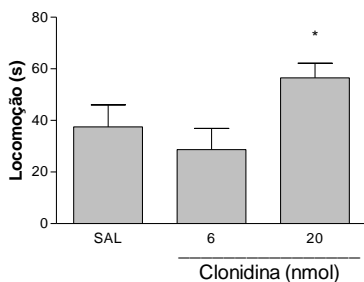


Figura 13: Aumento o tempo da locomoção na caixa de registros comportamentais ingestivos e não ingestivos induzida pela microinjeção de clonidina na concha do núcleo accumbens (AcbSh). Ratos foram microinjetados unilateralmente com salina (SAL, n=6/7) e clonidina (nas doses de 6, n=7 ou 20 nmol, n=8), no AcbSh e submetidos a caixa de registros comportamentais por 30 minutos. Cada coluna representa a média \pm o erro padrão da média. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com salina. (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações).

Tabela 3. Resultados da ANOVA de uma via indicando os efeitos nas variáveis comportamentais no teste da caixa de ingestão após a microinjeção unilateral de salina (0,9%) ou CLO no AcbSh.

Variáveis	SAL (n= 6)	CLO 6 (n= 7)	CLO 20 (n= 8)	ANOVA
Ingestão de alimentos (g)	0,16 ± 0,16	0,0	0,0	$F_{2,18} = 1,28$; p=NS
Exploração do alimento	3,50 ± 2,50	0,71 ± 0,35	0,0	$F_{2,18} = 2,09$; p=NS
Locomoção	37,50 ± 8,53	28,71 ± 8,16	56,50 ± 5,67*	$F_{2,18} = 4,02$; p<0,05
SAP	7,66 ± 2,01	3,71 ± 1,75	8,00 ± 1,08	$F_{2,18} = 2,73$; p=NS
Exploração vertical	25,66 ± 3,15	17,14 ± 5,84	28,37 ± 3,72	$F_{2,18} = 1,78$; p=NS
Auto-limpeza	11,16 ± 3,02	13,14 ± 2,07	16,00 ± 3,41	$F_{2,18} = 0,67$; p=NS

Ratos foram unilateralmente injetados com salina (0,9%) ou CLO nas doses de 6 e 20 nmol no AcbSh e foram subsequentemente testados (30 min) na caixa de ingestão. NS indica que não houve significância. *p<0.05. ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações.

Tabela 4. Resultados da ANOVA de uma via indicando os efeitos nas variáveis comportamentais no teste da caixa de ingestão após a microinjeção unilateral de salina (0,9%) ou FEN no AcbSh.

Variáveis	SAL (n= 7)	FEN 6 (n= 7)	FEN 20 (n= 7)	ANOVA
Ingestão de alimentos (g)	0,14 ± 0,14	0,0	0,0	$F_{2,18} = 1,00$; p=NS
Exploração do alimento	3,00 ± 2,17	0,28 ± 0,18	0,28 ± 0,28	$F_{2,18} = 1,52$; p=NS
Locomoção	32,71 ± 8,65	24,00 ± 2,62	35,42 ± 9,08	$F_{2,18} = 0,65$; p=NS
SAP	7,14 ± 1,77	4,00 ± 1,04	12,00 ± 3,36	$F_{2,18} = 3,12$; p=NS
Exploração vertical	23,00 ± 3,77	13,00 ± 2,67	20,42 ± 5,84	$F_{2,18} = 1,45$; p=NS
Auto-limpeza	11,14 ± 2,55	12,85 ± 3,01	11,85 ± 4,80	$F_{2,18} = 0,05$; p=NS

Ratos foram unilateralmente injetados com salina (0,9%) ou FEN nas doses de 6 e 20 nmol no AcbSh e foram subsequentemente testados (30 min) na caixa de ingestão. NS indica que não houve significância. * $p < 0.05$. ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações.

5. DISCUSSÃO

No LCE (HANDLEY e MITHANY, 1984), um teste pré-clínico de ansiedade, o comportamento do animal é conduzido por um conflito entre explorar o labirinto e, simultaneamente, evitar as áreas com propriedades mais aversivas para o animal, tais como as regiões mais iluminadas e destituídas de superfícies laterais, representadas pelos braços abertos (TREIT et al., 1993; PEREIRA et al., 2005; GODINHO et al., 2007). Esse conflito é resolvido através de esquiva do braço aberto superando a sua exploração, com os animais demonstrando uma clara preferência pelos braços fechados durante a exploração do labirinto (PELLOW et al., 1985). O nível de medo/ansiedade dos animais no LCE é avaliado pelo nível de exploração dos braços abertos (% entradas nos braços abertos e % de tempo nos braços abertos) ou por algumas variáveis etológicas, tais como SAP e imersão de cabeça (RODGERS et al., 1999; RODGERS et al., 1997). Já o número de entrada nos braços fechados é representativo da atividade locomotora do animal (FILE, 1992).

Os dados do presente estudo mostraram pela primeira vez que a microinjeção de CLO, um agonista dos α_2 -adrenoceptores, no AcbSh aumentou a porcentagem de tempo nos braços abertos em ratos saciados testados no LCE. Visto que a porcentagem de tempo nos braços abertos é inversamente relacionada com o nível de medo dos animais, é possível concluir que a ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos no AcbSh induziu um efeito do tipo ansiolítico. A ansiólise induzida pela CLO foi reforçada por medidas etológicas, tais como SAP e imersão de cabeça, que são positivamente e inversamente relacionadas com o nível de medo do animal, respectivamente. A microinjeção de CLO no AcbSh diminuiu o comportamento de SAP, tendo aumentado a ocorrência do comportamento de imersão de cabeça. Os dados também mostraram que a ansiólise induzida por CLO não pode ser atribuída a mudanças na atividade motora, uma vez que a dose ansiolítica não alterou o número de entradas nos braços fechados do labirinto, nem os comportamentos de exploração vertical e auto-limpeza.

O presente estudo está de acordo com os dados obtidos com o tratamento sistêmico com CLO, que também aponta para um efeito

ansiolítico da droga. A administração sistêmica de CLO neutraliza a ansiogênese induzida por Yoimbina em ratos (JOHNSTON e FILE, 1989) e, também, os comportamentos relacionados com ansiedade induzida pela privação de sono em camundongos foram revertidos pela administração sistêmica de CLO (SILVA et al., 2004) e a ansiólise induzida por etanol foi potencializada pelo pré-tratamento sistêmico com CLO (TAKSANDE et al., 2010). Além disso, a administração sistêmica de CLO aumentou a resposta punida no teste de conflito de Vogel (SÖDERPALM e ENGEL, 1988; MILLAN et al., 2000; LA MARCA e DUNN, 1994). Assim, uma revisão global da literatura indica que a administração sistêmica de CLO é ansiolítica, apesar de alguns estudos demonstrarem que o tratamento sistêmico com CLO é ineficaz no teste do conflito de Vogel (GOWER e TRICKLEBANK, 1988; SÖDERPALM e ENGEL, 1989). O presente estudo sugere que o efeito ansiolítico induzido pela administração sistêmica de CLO pode estar relacionado, pelo menos parcialmente, à ativação dos receptores α_2 no AcbSh. Uma vez que o LCE é um teste baseado em conflito, pode-se argumentar que o efeito ansiolítico ou anti-conflito, induzido pela ativação de α_2 -adrenoceptores no AcbSh é decorrente da diminuição do nível de medo do animal, o que aumenta a sua motivação para aproximação e exploração das regiões abertas/iluminadas do labirinto, ou seja, dos braços abertos.

No sistema nervoso central a fonte primária de aferências de noradrenalina (NA) ao AcbSh é o núcleo do trato solitário (NTS) (DELFS et al., 1998), enquanto que a principal fonte de aferências de dopamina (DA) é a área tegmental ventral (ATV; UNGERSTEDT, 1971). Tem sido demonstrado que a estimulação de projeções noradrenérgicas do NTS para o Acb facilita a memória emocional em ratos, um efeito bloqueado por inativação accumbal com bupivacaína (anestésico do tipo amida) (KERFOOT et al., 2008). A literatura também revela uma interação entre NA e DA a nível de terminais nervosos dopaminérgicos no Acb, visto que a estimulação de receptores adrenérgicos α_2 inibiu a liberação de DA estimulada eletricamente no Acb ratos (RUSSELL, et al., 1993), e clonidina reduziu a liberação de DA no Acb de ratos (NURSE, et al., 1985) .

Estudos utilizando a técnica de microdiálise *in vivo* têm mostrado que a microinjeção de dexmedetomidina (DMT), um agonista

$\alpha 2$, no Acb diminuiu a liberação de NA, sugerindo que os $\alpha 2$ -adrenoreceptores podem também regular diretamente a liberação de NA ao nível dos terminais do Acb (IHALAINEN e TANILA, 2004). Assim, é possível que o efeito ansiolítico induzido pela microinjeção CLO no Acb possa derivar de alterações na liberação de NA e DA no AcbSh. No entanto, a ansiólise induzida por CLO também poderia estar relacionada à liberação aumentada de GABA no Acb, uma vez que a administração sistêmica de CLO diminuiu a concentração microdialisada de DA no cérebro e aumentou a concentração de GABA na Acb (MURAI et al., 1998). Além disso, a co-administração sistêmica de CLO e midazolam (benzodiazepínico de ação ansiolítica), em doses sem efeito significativo sobre a liberação de DA, reduziu a liberação de DA no Acb (MURAI et al., 1998).

Assim, a microinjeção CLO no Acb poderia ser ansiolítica, diminuindo a liberação de DA no AcbSh, o que seria secundário ao aumento da liberação de GABA no Acb. Na verdade, demonstrou-se previamente que a microinjeção do agonistas GABAA e GABAB no AcbSh induz ansiólise em ratos testados no LCE (LOPES et al., 2007). Assim, é possível que o efeito ansiolítico induzido pela microinjeção CLO no AcbSh seja decorrente da diminuição da liberação de NA e/ou DA no AcbSh, ou mesmo a um aumento da liberação de GABA perto ou mesmo no próprio AcbSh.

Em relação aos dados de FEN, algumas discrepâncias surgem a partir do presente estudo. A microinjeção FEN, um agonista dos receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos, no Acb não alterou qualquer variável comportamental relacionada ao nível de medo/ansiedade no LCE. Nem as variáveis espaço-temporais, nem as variáveis etológicas foram alteradas pelas microinjeções de FEN no Acb. Isso é surpreendente, uma vez que os receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos parecem exercer um controle inibitório sobre o efluxo de NA accumbal (AONO et al., 2007). Também tem sido demonstrado que a FEN pode aumentar a liberação de DA no AcbSh (TUINSTRA e COOLS, 2000). Além disso, a ativação dos receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos no AcbSh é permissiva para a memória de frustração em ratos (KERFOOT et al., 2008). No entanto, é importante ter em mente que tanto agonistas quanto antagonistas dos receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos são geralmente ineficazes em testes pré-clínicos de ansiedade baseados em situações de conflito (para revisão ver Millan, 2003). Infelizmente, no presente estudo, a maioria dos

pontos de microinjeção foram localizados em sítios mais rostrais do AcbSh e é possível que a ativação dos receptores alfa 1 em sítios mais caudais do AcbSh seja necessária para alterar as medidas de ansiedade. Mais estudos ainda precisam ser realizados para confirmar o papel dos receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos no Acb sobre a modulação da ansiedade.

Em relação à atividade locomotora, ao contrário do que foi observado no LCE, a microinjeção de CLO no AcbSh induziu aumento da locomoção na caixa de ingestão. Acreditamos que esta discrepância possa ser atribuída aos diferentes critérios utilizados para avaliar a locomoção no LCE e na caixa de ingestão. No LCE, a locomoção foi avaliada pelo número de entrada nos braços fechados do labirinto, ao passo que na caixa de ingestão a locomoção foi estimada pela deambulação do animal dentro da caixa. De qualquer forma, é possível que a presença de diferentes contextos experimentais (LCE e caixa de ingestão) poderiam estar influenciando nossos resultados, uma vez que mudanças no ambiente podem influenciar a liberação de noradrenalina no córtex cerebral. Assim, tanto o efluxo de NA espontâneo e induzido por drogas seria dependente das condições ambientais no momento da avaliação (STANFORD, 1996), pelo menos no córtex cerebral.

Em relação ao comportamento alimentar, tem sido demonstrado na literatura que adrenoceptores localizados nos neurônios NA dentro do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) podem apresentar um papel antagônico sobre a ingestão de alimentos (WELLMAN, 2000). Por exemplo, a microinjeção intra-PVN de CLO aumentou a ingestão de alimentos em ratos saciados, um efeito bloqueado pela microinjeção local de antagonistas alfa 2-noradrenérgicos (GOLDMAN et al., 1985), enquanto que a microinjeção de agonistas $\alpha 1$ -adrenérgicos no PVN diminuiu a ingestão de alimentos (WELLMAN et al., 1993). No entanto, isso não parece ser verdadeiro no caso do AcbSh, uma vez que o presente estudo mostrou que as microinjeções de FEN e CLO foram ineficazes para alterar o consumo de alimentos, sugerindo que os receptores α adrenérgicos não modulam o comportamento alimentar no Acb. Esta hipótese é corroborada por um estudo anterior mostrando que a microinjeção de catecolaminas no Acb não alterou o comportamento alimentar em ratos (PAL et al., 2000). Desse modo, o presente estudo indica que os comportamentos ingestivos e defensivos são diferentemente modulados por α -adrenoreceptores no AcbSh, pelo menos em ratos saciados. Enquanto que a ativação de $\alpha 2$ -

adrenoceptores no AcbSh com CLO diminuiu o nível de medo/ansiedade no LCE, mas não alterou o consumo de alimentos, por outro lado, a ativação dos receptores adrenérgicos $\alpha 1$ no AcbSh com FEN não conseguiu mudar a emocionalidade e motivação do rato no LCE, bem como a ingestão de alimentos; sugerindo que os receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos no AcbSh não estão envolvidos na ingestão de alimentos e na modulação de comportamentos defensivos.

A falta de efeito sobre a ingestão de alimentos após a microinjeção de FEN e CLO pode ser argumentada por uma baixa motivação do animal relacionada ao comportamento alimentar, uma vez que os mesmos foram submetidos a um regime alimentar *ad-libitum*. De fato, os animais controle ingeriram uma pequena quantidade de ração e isso pode ter prejudicado a ocorrência de qualquer efeito hipofágico induzido por FEN. Além disso, também é possível argumentar que a baixa motivação dos animais saciados para comer pode ter prejudicado a detecção de qualquer efeito hiperfágico induzido por CLO. No entanto, a microinjeção no AcbSh, de agonistas GABA (STRATFORD e KELLEY, 1997) e antagonistas de glutamato (KELLEY e SWANSON, 1997) aumentaram a ingestão de alimentos em animais saciados, sugerindo que o GABA e o glutamato estão agindo para coibir a ingestão de alimentos em condições de alimentação livre. Entretanto, a ausência de efeitos ingestivos após microinjeções de CLO e FEN no AcbSh de ratos saciados não exclui a participação de circuitos adrenérgicos do AcbSh em outras condições alimentares, tais como restrição alimentar e ingestão de alimento palatável.

No presente estudo, uma outra questão importante deve ser levada em conta na interpretação da falta de efeito das microinjeções de CLO e FEN sobre ingestão de alimentos. É possível que um aumento na ingestão de alimentos possa ser mascarado pelo aumento de locomoção induzido pelas microinjeções unilaterais das drogas durante o teste de alimentação, apesar de ter sido demonstrado que a hipofagia e hiperlocomoção não se sobrepõem em ratos (WELLMAN et al., 2009). Além disso, em contraste com as injeções unilaterais, talvez a microinjeção bilateral de drogas poderia alterar o consumo de alimentos de uma forma mais evidente. Além disso, também é relevante para perceber que este estudo avaliou o comportamento alimentar após a execução do teste de ansiedade, o que poderia afetar o efeito da droga sobre o comportamento alimentar. Por exemplo, a ausência de efeito da

droga sobre a alimentação poderia ser atribuída a uma queda na biodisponibilidade da droga no AcbSh antes da avaliação ingestão de alimentos. No entanto, em um experimento similar (também com teste prévio de ansiedade), muscimol e baclofen (agonistas GABA) foram injetados no AcbSh em ratos saciados e os resultados apontaram um efeito hiperfágico (LOPES et al., 2007). Estas respostas foram de encontro com outros estudos (BASSO e KELLEY, 1999; KELLEY et al., 2005; REYNOLDS e BERRIDGE, 2001; STRATFORD e KELLEY, 1997) que avaliaram o comportamento alimentar imediatamente após a injeção de drogas, sem a utilização prévia de testes comportamentais. Em conjunto, esses dados sugerem que se os animais são ou não expostos ao LCE por 5min antes da avaliação do comportamento alimentar, não há alteração da resposta de ingestão alimentar evocada pelas drogas.

O presente estudo sugere que os comportamentos ingestivos e defensivos são diferentemente modulados por receptores α -adrenérgicos no AcbSh, pelo menos em ratos saciados. Enquanto a ativação dos α 2-adrenoreceptores no AcbSh com CLO diminuiu o nível de medo/ansiedade no LCE, não alterou a ingestão de alimentos. Por outro lado, a ativação dos receptores α 1-adrenérgicos no AcbSh com FEN não conseguiu alterar a emocionalidade do rato no LCE, bem como a ingestão de alimentos, sugerindo que os receptores α 1-adrenérgicos não estão envolvidos na modulação desses estados motivacionais em ratos saciados.

6. CONCLUSÕES

- A microinjeção de CLO (20nmol) na região da concha do Acb induziu efeito ansiolítico em ratos saciados testados do LCE.
- A microinjeção de FEN nas doses de 6 e 20 nMol foram inefetivas em alterar o nível de medo/ansiedade em ratos saciados testados no LCE.
- A microinjeção de CLO nas doses de 6 e 20 nMol, parece não modular o comportamento de ingestão de alimentos em ratos saciados.
- A microinjeção de FEN nas doses de 6 e 20 nMol, parece não modular o comportamento de ingestão alimentar em ratos saciados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERCROMBIE, E. D., KEEFE, K. A., DIFRISCHIA, D. S. e ZIGMOND, M. J. Differential effect of stress on *in vivo* dopamine release in striatum, nucleus accumbens and medial prefrontal cortex. *Journal of Neurochemistry*. **52**: 1655-1658, 1989.

ANNETT, L. E., MCGREGOR, A. e ROBBINS, T. W. The effects of ibotenic acid lesions of the nucleus accumbens on spatial learning and extinction in the rat. *Behavioural Brain Research*. **31**: 231-242, 1989.

AONO, Y., SAIGUSA, T., WATANABE, S., IWAKAMI, T., MIZOGUCHI, N., IKEDA, H., ISHIGE, K., TOMIYAMA, K., OI, Y., UEDA, K., RAUSCH, W. D., WADDINGTON, J. L., ITO, Y., KOSHIKAWA, N. e COOLS, A. R. Role of alpha adrenoceptors in the nucleus accumbens in the control of accumbal noradrenaline efflux: a microdialysis study with freely moving rats. *Journal of Neural Transmission*. **114**: 1135-1142, 2007.

BASAR, K., SESIA, T., GROENEWEGEN, H., STEINBUSCH, H. W. M., VISSER-VANDEWALLE, V. e TEMEL, Y. Nucleus accumbens and impulsivity. *Progress in Neurobiology*. **92**: 533-557, 2010.

BASSO, A. M. e KELLEY, A. E. Feeding Induced by GABAA Receptor Stimulation Within the Nucleus Accumbens Shell: Regional Mapping and Characterization of Macronutrient and Taste Preference. *Behavioral Neuroscience*. **113**: 324-336, 1999.

BERRIDGE, C. W., STRATFORD, T. L., FOOTE, S. L. e KELLEY, A. E. Distribution of dopamine beta-hydroxylase-like immunoreactive fibers within the shell subregion of the nucleus accumbens. *Synapse*. **3**: 230-241, 1997.

BRUNELLO, N., BLIER, P., JUDD, L. L., MENDLEWICZ, J., NELSON, C. J., SOUERY, D., ZOHAR, J. e RACAGNI, G. Noradrenaline in mood and anxiety disorders: basic and clinical studies. *International Clinical Psychopharmacology*. **18**: 191-202, 2003.

CARLSSON, M. e CARLSSON, A. Schizophrenia: A Subcortical Neurotransmitter Imbalance Syndrome? *Schizophrenia Bulletin*. **16**: 425-432, 1990.

CAROBREZ, A. P. e BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. **29**: 1193-1205, 2005.

CHEN, J. e SHI, S. A review of neuroimaging studies of anxiety disorders in China. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. **7**: 241-249, 2011.

CONNOR, K. M. e DAVIDSON, J. R. T. Generalized anxiety disorder: neurobiological and pharmacotherapeutic perspectives. *Biological Psychiatry*. **44**: 1286-1294, 1998.

CRUZ, A. P. M., FREI, F. e GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **49**: 171-176, 1994.

DA CUNHA, I. C., DE NAZARETH, A. M., VARGAS, J. C., FERRAZ, A., NETO, J. M., PASCHOALINI, M. A. e FARIA, M. S. The microinjection of AMPA receptor antagonist into the accumbens shell failed to change food intake, but reduced fear-motivated behaviour in free-feeding female rats. *Behavioural Brain Research*. **193**: 243-247, 2008a.

DA CUNHA, I. C., LOPES, A. P. F., STEFFENS, S. M., FERRAZ, A., VARGAS, J. C., DE LIMA, T. C. M., MARINO NETO, J., PASCHOALINI, M. A. e FARIA, M. S. The microinjection of AMPA receptor antagonist into the accumbens shell, but not into

the accumbens core, induces anxiolysis in an animal model of anxiety. *Behavioural Brain Research*. **188**: 91-99, 2008b.

DAMSMA, G., PFAUS, J. G., WENKSTERN, D., PHILLIPS, A. G. e FIBIGER, H. C. Sexual Behavior Increases Dopamine Transmission in the Nucleus Accumbens and Striatum of Male Rats: Comparison With Novelty and Locomotion. *Behavioral Neuroscience*. **106**: 181-191, 1992.

DAVIDSON, R. J. e IRWIN, W. The functional neuroanatomy of emotion and affective style. *Trends in Cognitive Sciences*. **3**: 11-21, 1999.

DELFS, J. M., ZHU, Y., DRUHAN, J. P. e ASTON-JONES, G. S. Origin of noradrenergic afferents to the shell subregion of the nucleus accumbens: anterograde and retrograde tract-tracing studies in the rat. *Brain Research*. **806**: 127-140, 1998.

DEV, B. R. e PHILIP, L. Extracellular catechol and indole turnover in the nucleus of the solitary tract of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rats in response to drug-induced changes in arterial blood pressure. *Brain Research Bulletin*. **40**: 111-116, 1996.

FILE, S. E., Behavioural detection of anxiolytic action. In: Elliott J.M., Heal D.J., Marsden C.A., editors. *Experimental approaches to anxiety and depression*. New York: John Wiley & Sons, 25-44, 1992.

FILE, S. E., LIPPA, A. S., BEER, B., LIPPA, M. T. Animal tests of anxiety. In: *Current Protocols in Pharmacology*. 2005. Disponível em: <http://www.currentprotocols.com/protocol/ph0538>.

GABRIEL, M. e SELLER, H. Interaction of baroreceptor afferents from carotid sinus and aorta at the nucleus tractus solitarii. *European Journal of Physiology*. **318**: 7-20, 1970.

GARGIULO, P. A. Thyrotropin releasing hormone injected into the nucleus accumbens septi selectively increases face grooming in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **29**: 805-810, 1996.

GENN, R. F., TUCCI, S. A., THOMAS, A., EDWARDS, J. E. e FILE, S. E. Age-associated sex differences in response to food deprivation in two animal tests of anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. **27**: 155-161, 2003a.

GENN, R. F., TUCCI, S., EDWARDS, J. E. e FILE, S. E. Dietary Restriction and Nicotine can Reduce Anxiety in Female Rats. *Neuropsychopharmacology*. **28**: 1257-1263, 2003b.

GODART, N.T., FLAMENT, M.F., LECRUBIER, Y., JEAMMET, P. Anxiety disorders in anorexia nervosa and bulimia nervosa: co-morbidity and chronology of appearance. *European Psychiatry*. **15**, 38-45. 2000.

GODINHO, M. A. D. A., MENEHINI, L., LUCINDA, A. M., BORGES, F. R. M., SAKAE, D. Y., MARINO NETO, J., PASCHOALINI, M. A., DE LIMA, T. C. M. e FARIA, M. S. An approach to evaluate the ability of rats to discriminate different levels of illumination in the plus maze test: Effects of scopolamine. *Behavioural Brain Research*. **180**: 86-94, 2007.

GOLDMAN, C.K., MARINO, L., LEIBOWITZ, S.F. Postsynaptic alpha 2-noradrenergic receptors mediate feeding induced by paraventricular nucleus injection of norepinephrine and clonidine. *European Journal of Pharmacology*. **115**, 11-19, 1985.

GOWER, A. J. e TRICKLEBANK, M. D. [alpha]2-adrenoceptor antagonist activity may account for the effects of buspirone in an anticonflict test in the rat. *European Journal of Pharmacology*. **155**: 129-137, 1988.

GROENEWEGEN, H. J., VERMEULEN-VAN DER ZEE, E., TE KORTSCHOT, A., WITTER, M. P. Organization of the projections from the subiculum to the ventral striatum in the rat. A study using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience*. **23**: 103-120, 1987.

GROENEWEGEN, H. J., BERENDSE, H. W. e HABER, S. N. Organization of the output of the ventral striatopallidal system in the rat: Ventral pallidal efferents. *Neuroscience*. **57**: 113-142, 1993.

HALFORD, J. C. G., WANNINAYAKE, S. C. D. e BLUNDELL, J. E. Behavioral Satiety Sequence (BSS) for the Diagnosis of Drug Action on Food Intake. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **61**: 159-168, 1998.

HANDLEY, S. L. e MITHANI, S. Effects of alpha2-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of fear-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*. **327**: 1-5, 1984.

HEIDBREDER, C. A. e GROENEWEGEN, H. J. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. **27**: 555-579, 2003.

IHALAINEN, J. A. e TANILA, H. In vivo regulation of dopamine and noradrenaline release by alpha2A-adrenoceptors in the mouse nucleus accumbens. *Journal of Neurochemistry*. **91**: 49-56, 2004.

JOHNSTON, A. L. e FILE, S. E. Yohimbine's anxiogenic action: Evidence for noradrenergic and dopaminergic sites. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **32**: 151-156, 1989.

KALK, N.J., NUTT, D.J., LINGFORD-HUGHES, A.R. The role of central noradrenergic dysregulation in anxiety disorders:

evidence from clinical studies. *Journal of Psychopharmacology*. **25**: 3-16, 2011.

KELLEY, A. E. e SWANSON, C. J. Feeding induced by blockade of AMPA and kainate receptors within the ventral striatum: a microinfusion mapping study. *Behavioural Brain Research*. **89**: 107-113, 1997.

KELLEY, A. E., BALDO, B. A., PRATT, W. E. e WILL, M. J. Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: Integration of energy, action and reward. *Physiology & Behavior*. **86**: 773-795, 2005.

KERFOOT, E. C., CHATTILLION, E. A. e WILLIAMS, C. L. Functional interactions between the nucleus tractus solitarius (NTS) and nucleus accumbens shell in modulating memory for arousing experiences. *Neurobiology of Learning and Memory*. **89**: 47-60, 2008.

KINZIG, K. P. e HARGRAVE, S. L. Adolescent activity-based anorexia increases anxiety-like behavior in adulthood. *Physiology & Behavior*. **101**: 269-276.

KOOB, G. F. Neural Mechanisms of Drug Reinforcement. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **654**: 171-191, 1992.

KOSKINA, A., VAN DEN EYNDE, F., MEISEL, S., CAMPBELL, I. C., SCHMIDT, U. Social appearance anxiety and bulimia nervosa. *King's College London, Institute of Psychiatry, Section of Eating Disorders Eat Weight Disord*. **16**: 142-5. 2011.

LA MARCA, S., DUNN, R.W. The alpha2-antagonists idazoxan and rauwolscine but not yohimbine or piperoxan are anxiolytic in the vogel lick-shock conflict paradigm following intravenous administration. *Life Sciences*. **54**, PL179-184, 1994.

LOPES, A. P. F., DA CUNHA, I. C., STEFFENS, S. M., FERRAZ, A., VARGAS, J. C., DE LIMA, T. C. M., NETO, J. M., FARIA, M. S. e PASCHOALINI, M. A. GABAA and GABAB agonist microinjections into medial accumbens shell increase feeding and induce anxiolysis in an animal model of anxiety. *Behavioural Brain Research*. **184**: 142-149, 2007.

LOPES, A. P. F., GANZER, L. S., BORGES, A. C., KOCHENBORGER, L., JANUÁRIO, A. C. U., FARIA, M. S., MARINO-NETO, J. e PASCHOALINI, M. A. Effects of GABA ligands injected into the nucleus accumbens shell on fear/anxiety-like and feeding behaviours in food-deprived rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **101**: 41-48.

MACDONALD, A. F., BILLINGTON, C. J. e LEVINE, A. S. Alterations in food intake by opioid and dopamine signaling pathways between the ventral tegmental area and the shell of the nucleus accumbens. *Brain Research*. **1018**: 78-85, 2004.

MANSUR, S. S., TERENCE, M. G., NETO, J. M., FARIA, M. S. e PASCHOALINI, M. A. Changes in food intake and anxiety-like behaviors after clonidine injected into the median raphe nucleus. *Behavioural Brain Research*. **212**: 71-77, 2010.

MANSUR, S. S., TERENCE, M. G., NETO, J. M., FARIA, M. S. e PASCHOALINI, M. A. Phenylephrine into the median raphe nucleus evokes an anxiolytic-like effect in free-feeding rats but does not alter food intake in free feeding rats. *Behavioural Brain Research*. **217**: 209-214, 2011.

MÄLLO, T., ALTHOJA, A., KÕIV, K., TÕNISSAAR, M., ELLER, M. e HARRO, J. Rats with persistently low or high exploratory activity: Behaviour in tests of anxiety and depression, and extracellular levels of dopamine. *Behavioural Brain Research*. **177**: 269-281, 2007.

MILLAN, M.J., DEKEYNE, A., NEWMAN-TANCREDI, A., CUSSAC, D., AUDINOT, V., MILLIGAN, G., DUQUEYROIX, D., GIRARDON, S., MULOT, J., BOUTIN, J.A., NICOLAS, J.P., RENOARD-TRY, A., LACOSTE, J.M., CORDI, A. S18616, a highly potent spiroimidazoline agonist at α_2 -adrenoceptors. I. Receptor profile, antinociceptive and hypothermic actions in comparison with dexmedetomidine and clonidine. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. **295**, 1192–1205, 2000.

MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology*. **70**: 83-244, 2003.

MORGANE, P. J., GALLER, J. R. e MOKLER, D. J. A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Progress in Neurobiology*. **75**: 143-160, 2005.

MURAI, T., YOSHIDA, Y., KOIDE, S., TAKADA, K., MISAKI, T., KOSHIKAWA, N. e COOLS, A. R. Clonidine Reduces Dopamine and Increases GABA in the Nucleus Accumbens: An In Vivo Microdialysis Study. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **60**: 695-701, 1998.

NAUTA, W. J. H., SMITH, G. P., FAULL, R. L. M. e DOMESICK, V. B. Efferent connections and nigral afferents of the nucleus accumbens septi in the rat. *Neuroscience*. **3**: 385-401, 1978.

NURSE, B., RUSSELL, V. A. e TALJAARD, J. J. F. Effect of chronic desipramine treatment on adrenoceptor modulation of [3H]dopamine release from rat nucleus accumbens slices. *Brain Research*. **334**: 235-242, 1985.

OTTONI, E. B. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers*. **32**: 446-449, 2000.

PAL P, RAJ S.S., MOHAN M, PAL G.K. Modulation of feeding and drinking behaviour by catecholamines injected into nucleus

accumbens in rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*. **44**(1):24-32, 2000.

PATON, J. F. R. Pattern of Cardiorespiratory Afferent Convergence to Solitary Tract Neurons Driven by Pulmonary Vagal C-Fiber Stimulation in the Mouse. *Journal of Neurophysiology*. **79**: 2365-2373, 1998.

PATON, J. F. R.. Convergence properties of solitary tract neurons driven synaptically by cardiac vagal afferents in the mouse. *The Journal of Physiology*. **508**: 237-252, 1998.

PAXINOS, G. e WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press*. 2007.

PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S. E. e BRILEY, M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. **14**: 149-167, 1985.

PEREIRA, L. O., DA CUNHA, I. C., NETO, J. M., PASCHOALINI, M. A. e FARIA, M. S. The gradient of luminosity between open/enclosed arms, and not the absolute level of Lux, predicts the behaviour of rats in the plus maze. *Behavioural Brain Research*. **159**: 55-61, 2005.

PEZZE, M. A. e FELDON, J. Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. *Progress in Neurobiology*. **74**: 301-320, 2004.

PLIAKAS, A. M., CARLSON, R. R., NEVE, R. L., KONRADI, C., NESTLER, E. J. e CARLEZON, W. A., JR. Altered Responsiveness to Cocaine and Increased Immobility in the Forced Swim Test Associated with Elevated cAMP Response Element-Binding Protein Expression in Nucleus Accumbens. *The Journal of Neuroscience*. **21**: 7397-7403, 2001.

RACOTTA, R. e SOTO-MORA, L. M. Specificity of alpha- and beta-adrenergic inhibition of water and food intake. *Physiology & Behavior*. **53**: 361-365, 1993.

RACOTTA, R., SOTO-MORA, L. M., PALACIOS, E. e QUEVEDO, L. Norepinephrine inhibition of water and food intake: Comparison with vasopressin effects. *Physiology & Behavior*. **57**: 141-145, 1995.

RAMOS, E. J. B., MEGUID, M. M., CAMPOS, A. C. L. e COELHO, J. C. U. Neuropeptide Y, [alpha]-melanocyte-stimulating hormone, and monoamines in food intake regulation. *Nutrition*. **21**: 269-279, 2005.

RESSLER, K. L. e NEMEROFF, C. B. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. . *Depression and Anxiety* **12**: 2-19, 2000.

REYNOLDS, S. M. e BERRIDGE, K. C. Fear and Feeding in the Nucleus Accumbens Shell: Rostrocaudal Segregation of GABA-Elicited Defensive Behavior Versus Eating Behavior. *The Journal of Neuroscience*. **21**: 3261-3270, 2001.

REYNOLDS, S. M. e BERRIDGE, K. C.. Positive and Negative Motivation in Nucleus Accumbens Shell: Bivalent Rostrocaudal Gradients for GABA-Elicited Eating, Taste "Liking"/"Disliking" Reactions, Place Preference/Avoidance, and Fear. *The Journal of Neuroscience*. **22**: 7308-7320, 2002.

REYNOLDS, S. M. e BERRIDGE, K. C.. Glutamate motivational ensembles in nucleus accumbens: rostrocaudal shell gradients of fear and feeding. *European Journal of Neuroscience*. **17**: 2187-2200, 2003.

RODGERS, R. J. e DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. **21**: 801-810, 1997.

RODGERS, R. J., CAO, B.-J., DALVI, A. e HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **30**: 289-304, 1997.

RODGERS, R. J., HALLER, J., HOLMES, A., HALASZ, J., WALTON, T. J. e BRAIN, P. F. Corticosterone response to the plus-maze: High correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiology & Behavior*. **68**: 47-53, 1999.

RODGERS, R. J. e JOHNSON, N. J. T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **52**: 297-303, 1995.

RUSSELL, V. A., LAMM, M. C. e TALJAARD, J. J. Lack of interaction between alpha-2-adrenoceptors and dopamine D2-receptors in mediating their inhibitory effects on [3H]dopamine release from rat nucleus accumbens slices. *Neurochemical Research*. **18**: 285-289, 1993.

SALAMONE, J. D. The involvement of nucleus accumbens dopamine in appetitive and aversive motivation. *Behavioural Brain Research*. **61**: 117-133, 1994.

SCHOFFELMEER, A. N. M., VANDERSCHUREN, L. J. M. J., VAN ROYEN, D. E., WARDEH, G., HOGENBOOM, F. e MULDER, A. H. Lack of α 2-adrenoceptor autoregulation of noradrenaline release in rat nucleus accumbens slices. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. **357**: 87-90, 1997.

SEAMANS, J. K. e PHILLIPS, A. G. Selective Memory Impairments Produced by Transient Lidocaine-Induced Lesions of the Nucleus Accumbens in Rats. *Behavioral Neuroscience*. **108**: 456-468, 1994.

SETEM, J., PINHEIRO, A. P., MOTTA, V. A., MORATO, S. e CRUZ, A. P. M. Ethopharmacological Analysis of 5-HT Ligands

on the Rat Elevated Plus-Maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **62**: 515-521, 1999.

SETLOW, B. e MCGAUGH, J. L. Sulpiride Infused Into the Nucleus Accumbens Posttraining Impairs Memory of Spatial Water Maze Training. *Behavioral Neuroscience*. **112**: 603-610, 1998.

SETLOW, B., ROOZENDAAL, B. e MCGAUGH, J. L. Involvement of a basolateral amygdala complex–nucleus accumbens pathway in glucocorticoid-induced modulation of memory consolidation. *European Journal of Neuroscience*. **12**: 367-375, 2000.

SHAPIRA, N. A., OKUN, M. S., WINT, D., FOOTE, K. D., BYARS, J. A., BOWERS, D., SPRINGER, U. S., LANG, P. J., GREENBERG, B. D., HABER, S. N. e GOODMAN, W. K. Panic and fear induced by deep brain stimulation. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. **77**: 410-412, 2006.

SIEGFRIED, Z., BERRY, E. M., HAO, S. e AVRAHAM, Y. Animal models in the investigation of anorexia. *Physiology & Behavior*. **79**: 39-45, 2003.

SILVA, R. H., KAMEDA, S. R., CARVALHO, R. C., TAKATSU-COLEMAN, A. L., NIIGAKI, S. T., ABÍLIO, V. C., TUFIK, S. e FRUSSA-FILHO, R. Anxiogenic effect of sleep deprivation in the elevated plus-maze test in mice. *Psychopharmacology*. **176**: 115-122, 2004.

SILVERSTONE, P. H. Qualitative review of SNRIs in anxiety. *Journal of Clinical Psychiatry* **65**: 19-28, 2004.

SÖDERPALM, B. e ENGEL, J. A. Biphasic effects of clonidine on conflict behavior: involvement of different alpha-adrenoceptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **30**: 471-477, 1988.

SÖDERPALM, B. e ENGEL, J. A.. Alpha 2-Adrenoceptor antagonists potentiate the anticonflict and the rotarod impairing effects of benzodiazepines. *Journal of Neural Transmission*. **76**: 191-204, 1989.

STANFORD, S. C. Stress: A major variable in the psychopharmacologic response. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **54**: 211-217, 1996.

STRATFORD, T. R. e KELLEY, A. E. GABA in the Nucleus Accumbens Shell Participates in the Central Regulation of Feeding Behavior. *The Journal of Neuroscience*. **17**: 4434-4440, 1997.

STRATFORD, T. R., SWANSON, C. J. e KELLEY, A. Specific changes in food intake elicited by blockade or activation of glutamate receptors in the nucleus accumbens shell. *Behavioural Brain Research*. **93**: 43-50, 1998.

STRATFORD, T. R. e KELLEY, A. E. Evidence of a Functional Relationship between the Nucleus Accumbens Shell and Lateral Hypothalamus Subserving the Control of Feeding Behavior. *The Journal of Neuroscience*. **19**: 11040-11048, 1999.

STURM, V., LENARTZ, D., KOULOUSAKIS, A., TREUER, H., HERHOLZ, K., KLEIN, J. C. e KLOSTERKÖTTER, J. The nucleus accumbens: a target for deep brain stimulation in obsessive-compulsive- and anxiety-disorders. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. **26**: 293-299, 2003.

SWINBOURNE, J.M., TOUYZ, S.W. The co-morbidity of eating disorders and anxiety disorders: a review. *European Eating Disorders Review*. **15**, 253-274. 2007.

TAKSANDE, B. G., KOTAGALE, N. R., PATEL, M. R., SHELKAR, G. P., UGALE, R. R. e CHOPDE, C. T. Agmatine, an endogenous imidazoline receptor ligand modulates ethanol

anxiolysis and withdrawal anxiety in rats. *European Journal of Pharmacology*. **637**: 89-101, 2010.

TANAKA, M., YOSHIDA, M., EMOTO, H. e ISHII, H. Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. *European Journal of Pharmacology*. **405**: 397-406, 2000.

TRIPICCHIO, A. Psicofarmacologia III- Ansiolíticos. Disponível em: <http://www.redepsi.com.br/portal>. Acesso em: Agosto de 2011.

TREIT, D., MENARD, J. e ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **44**: 463-469, 1993.

TUINSTRA, T. e COOLS, A. R. Newly synthesized dopamine in the nucleus accumbens is regulated by [beta]-adrenergic, but not [alpha]-adrenergic, receptors. *Neuroscience*. **98**: 743-747, 2000.

UNGERSTEDT, U. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta. Physiologica Scandinavica Supplementum*. **367**: 1-48, 1971.

USIELLO, A., SARGOLINI, F., ROULLET, P., AMMASSARI-TEULE, M., PASSINO, E., OLIVERIO, A. e MELE, A. N-Methyl-D-aspartate receptors in the nucleus accumbens are involved in detection of spatial novelty in mice. *Psychopharmacology*. **137**: 175-183, 1998.

VARDAR, E., ERZENGIN, M. The Prevalence of Eating Disorders (EDs) and Comorbid Psychiatric Disorders in Adolescents: A Two-Stage Community-Based Study. *Turkish Journal of Psychiatry*. 1-7, 2011.

WELLMAN P.J., DAVIES, B.T., MORIEN, A., McMAHON, L. Modulation of feeding by hypothalamic paraventricular nucleus

alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors. *Life Sciences*. **53**, 669-679, 1993.

WELLMAN, P. J. Norepinephrine and the control of food intake. *Nutrition*. **16**: 837-842, 2000.

WELLMAN, P.J., DAVIS, K., SHANE CLIFFORD, P., ROTHMAN, R.B., BLOUGH, B.E. Changes in feeding and locomotion induced by amphetamine analogs in rats. *Drug Alcohol Depend.* 100, 234-239. 2009.

ZAHM, D. S. e BROG, J. S. On the significance of subterritories in the "accumbens" part of the rat ventral striatum. *Neuroscience*. **50**: 751-767, 1992.

ZARRINDAST, M.-R., BABAPOOR-FARROKHRAN, S., BABAPOOR-FARROKHRAN, S. e REZAYOF, A. Involvement of opioidergic system of the ventral hippocampus, the nucleus accumbens or the central amygdala in anxiety-related behavior. *Life Sciences*. **82**: 1175-1181, 2008.

ZNAMENSKY, V., ECHO, J. A., LAMONTE, N., CHRISTIAN, G., RAGNAUTH, A. e BODNAR, R. J. [gamma]-Aminobutyric acid receptor subtype antagonists differentially alter opioid-induced feeding in the shell region of the nucleus accumbens in rats. *Brain Research*. **906**: 84-91, 2001.

8. ANEXOS

Artigo publicado em 2011.

Título: Modulation of fear/anxiety responses, but not food intake, following α -adrenoceptor agonist microinjections in the nucleus accumbens shell of free-feeding rats

Revista: Neuropharmacology In: Special Issue Anxiety and Depression

DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.08.019



Modulation of fear/anxiety responses, but not food intake, following α -adrenoceptor agonist microinjections in the nucleus accumbens shell of free-feeding rats

Larissa Kochenborger*, Débora Zanatta, Luigi Marins Berretta, Ana Paula Fraga Lopes, Bruna Luiza Wunderlich, Ana Cláudia Januário, José Marino Neto, Mariana Graciela Terenzi, Marta Aparecida Paschoalini, Moacir Serralvo Faria*

Department of Physiological Sciences, Centre of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina (UFSC), 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 April 2011
Received in revised form
10 August 2011
Accepted 11 August 2011

Keywords:
Nucleus accumbens
Clonidine
Phenylephrine
Elevated plus-maze
Anxiety
Food intake

ABSTRACT

This study investigated the effect of α -adrenoceptor agonists microinjected into the shell region of the nucleus accumbens (AcbSh) on feeding and anxiety-related behaviors in free-feeding rats. Male Wistar rats with a chronically implanted cannula into the AcbSh were unilaterally microinjected with either clonidine (CLON, α_2 -adrenoceptor agonist) or phenylephrine (PHEN, α_1 -adrenoceptor agonist) at the doses of 6 and 20 nmol and submitted to the elevated plus-maze (EPM), a pre-clinical test of anxiety. Immediately after the EPM test, the animals underwent food intake evaluation for 30 min. The data showed that rats microinjected with CLON (20 nmol/0.2 μ l) into the AcbSh exhibited increased %Open arm time, which is compatible with an anxiolytic-like effect. The CLON-induced anxiolysis was corroborated by increased head-dipping and decreased stretched-attend posture, two ethologically derived behaviors which are fear/anxiety-motivated. The animal's locomotor activity was not changed by 20 nmol CLON microinjection into the AcbSh. However, neither dose of PHEN microinjected into the AcbSh was able to alter either the spatial-temporal or ethological variables representative of fear/anxiety and locomotion. Food intake was not altered by any dose of CLON and PHEN microinjected into the AcbSh, but the 20 nmol CLON microinjection induced increased motor activity in the feeding test. The data suggests that noradrenergic projections to the AcbSh may underlie fear/anxiety modulation through α_2 -adrenoceptor in the AcbSh, while feeding behavior was unaffected by noradrenergic modulation in the AcbSh of free-feeding rats.

This article is part of a Special Issue entitled 'Anxiety and Depression'.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The nucleus accumbens (Acb) is an important area of the basal forebrain acting as an interface between corticostriatal information-processing regions and motor output systems (Smith-Roe and Kelley, 2000). It is involved in motivation and reinforcement (Koob, 1992; Salamone, 1994), ingestive and defensive behavior (Pliakos et al., 2001), cognition (Annett et al., 1989; Davidson and Irwin,

1999; Seamans and Phillips, 1994; Setlow and McLaughlin, 1998; Ustello et al., 1998), motor activity (Carlsson and Carlsson, 1990; Gargiulo, 1996), sexual behavior (Damsma et al., 1992) and stress (Abercrombie et al., 1989).

The Acb is an anatomically heterogeneous structure and can be divided into two regions: the core and the shell (AcbSh). The AcbSh is involved with defensive behavioral responses elicited by noxious or threatening stimuli (Beck and Fibiger, 1995; Liberzon et al., 1999; Inoue et al., 1994). For example, the microinjection of GABA_A agonist into the caudal sites of the AcbSh elicits defensive behaviors, while the rostral microinjections increases food intake in rats (Reynolds and Berridge, 2001). In the same vein, the microinjection of AMPA/kainate antagonists into the caudal AcbSh elicits defensive treading behavior, while the same microinjection at rostral sites of the AcbSh increases food intake in rats (Reynolds and Berridge, 2003). Previous studies conducted in our laboratory have also

Abbreviations: Acb, Nucleus Accumbens; AcbSh, Accumbens Shell; EPM, Elevated Plus-Maze; PHEN, phenylephrine; CLON, clonidine; SAP, Stretched-attend posture; NA, Noradrenaline; NTS, Nucleus tractus solitarius; DA, Dopamine; VTA, Ventral tegmental area; DMT, Desmethyldetimidine.

* Corresponding authors. Fax: +55 48 3721 9672.

E-mail addresses: larissakochen@gmail.com (L. Kochenborger), serralvo@ufsc.br (M. S. Faria).